

Syntese og biologisk evaluering av nye legumainsubstrater med antineoplastisk effekt, som mulige selektive hemmere av tumorvekst

Masteroppgave i Farmasi

Luan Minh Nguyen



Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

**Syntese og biologisk evaluering av nye
legumainsubstrater med antineoplastisk effekt, som
mulige selektive hemmere av tumorvekst**

Masteroppgave i Farmasi

Luan Minh Nguyen

Veiledere

Førsteamanuensis Pål Rongved

Doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand

Avdeling for Farmasøytisk kjemi

og

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

© Luan M. Nguyen

2012

Syntese og biologisk evaluering av nye legumainsubstrater med antineoplastisk effekt, som mulige selektive hemmere av tumorvekst

Luan Minh Nguyen

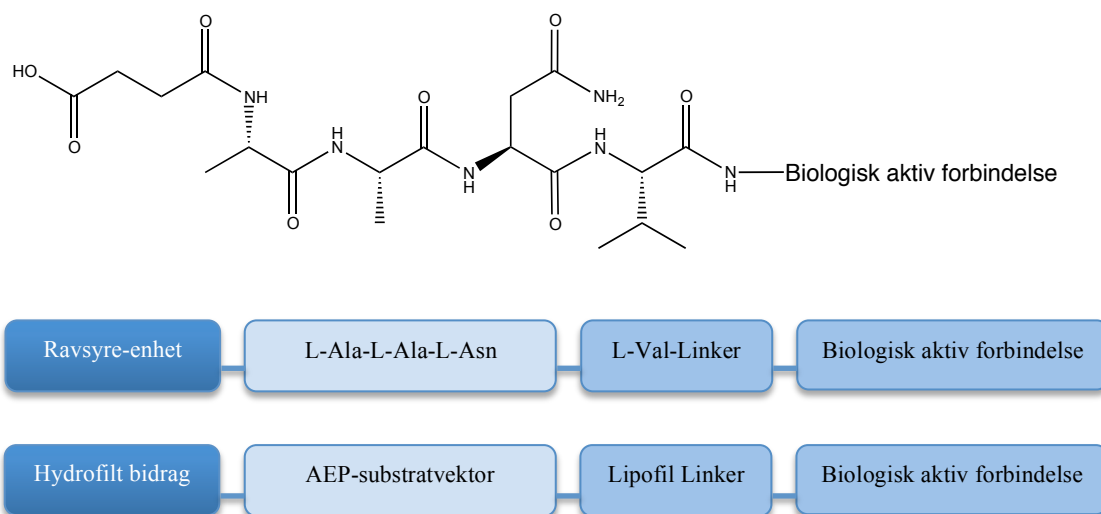
<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

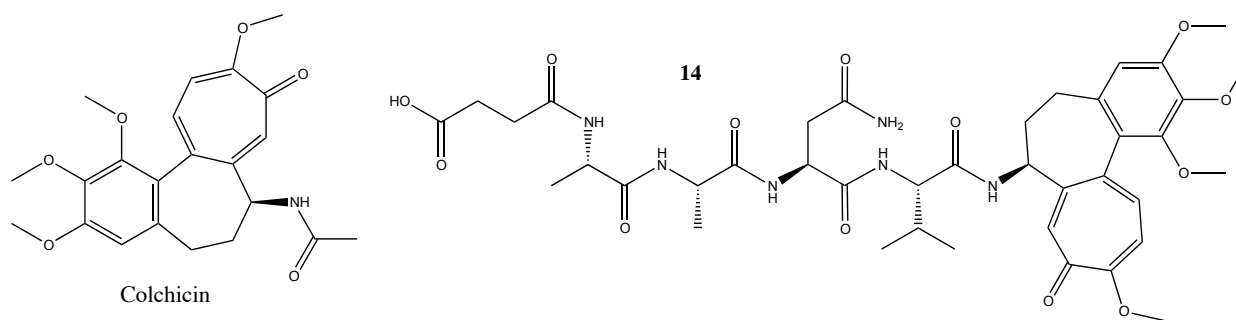
Mikromiljøet i og rundt tumor er beriket med et bredt spektrum av ulike proteaser der legumain er en forholdsvis nyoppdaget cysteinprotease. I friske vev i menneskekroppen er legumain kun detekterbar i små mengder, derimot er enzymet sterkt overuttrykt i flere typer solide tumor. Legumain viser spesifikt asparaginyln endopeptidase (AEP) aktivitet i motsetning til andre kjente lysosomale endopeptidaser som viser en bredspektret kløyvingsaktivitet. Denne kombinasjonen av enzymatisk uttrykks- og kløyvingsselektivitet gjør legumain til et meget interessant legemiddelmål både for tumoravbildning, enzymatisk aktivitetregulering og enzymatisk prodrugaktivering.

I oppgaven ble legumains egenskaper benyttet for å syntetisere prodrug i forsøk på å oppnå selektivt hemming av tumorvekst. En peptidvektor ble syntetisert som substrat for legumain. Vektoren ble så koblet med et colchicin- og et sinkchelaterende derivat (se **figur A**).



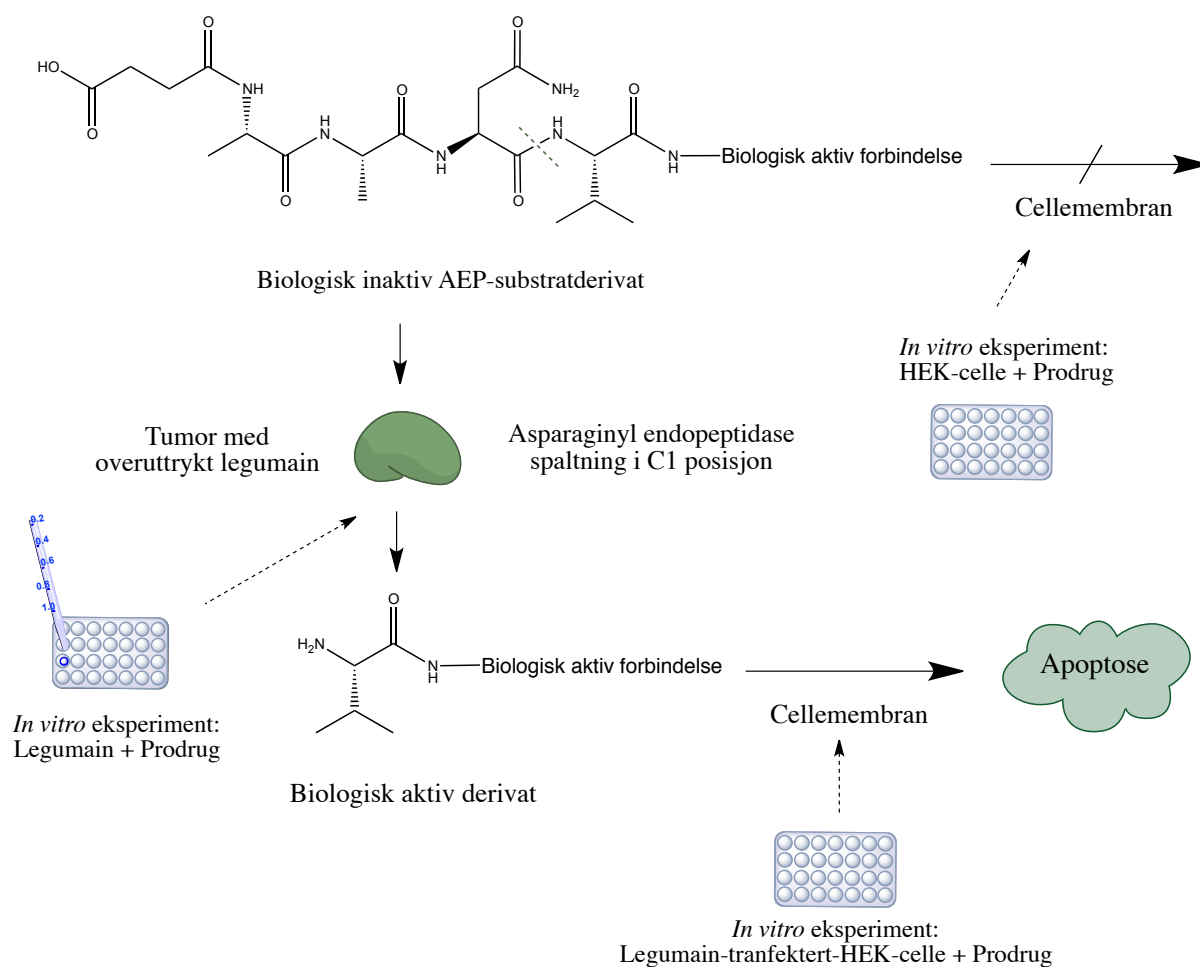
Figur A. Ala-Ala-Asn peptidvektor med ravsyre enhet og Val-linker til biologisk aktiv forbindelse, biologisk aktiv forbindelse = 1. Colchicin eller 2. Sinkchelaterende forbindelse.

Forbindelse **14** (se **figur B**), colchicin-AEP-substrat ble syntetisert som et prodrug og evaluert *in vitro* med et rent legumain enzymekstrakt. Legumain spaltet prodrugene som tilsiktet ved asparagin og valin-colchicin ble frigjort (se **figur C**).



Figur B. Colchicin og prodrug-forbindelse 14.

Videre biologisk evaluering i HEK- og legumain-transfektete-HEK-celler er skissert i samarbeid med avdeling for Farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk Institutt i Universitet i Oslo (se **figur C**).



Figur C. Spaltning av prodrug-forbindelse 14 ved legumain og skisse over eksperimenter for biologisk evaluering.

Forord

Hovedtyngden av dette prosjektet ble utført ved seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitet i Oslo. Hovedveileder for oppgaven er førsteamanuensis Pål Rongved. Jeg ønsker å takke ham for tilrettelegging, inspirasjon, råd og veiledning gjennom arbeidet med masteroppgaven.

Videre ønsker jeg å fremheve en stor takk til doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand. Hjertelig takk for god hjelp og dyktig rådgivning relatert til teoretisk som i eksperimentelt kjemi gjennom hele syntesearbeidet.

Jeg ønsker også å benytte anledningen til å takke avdelingsingeniørene Iuliana Johanssen og Atle Haugen, samt alle ansatte og studenter på avdelingen. Også skal jeg ikke glemme å rette en stor takk til vedkommende som har bidratt med hjelp for å rense sluttproduktet ved preparativ HPLC.

I tillegg vil jeg takke professor Rigmor Solberg og professor Harald T. Johansen ved avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap for hjelp og rådgivning i den biologisk evalueringsdelen mot slutten av oppgaven.

Sist men ikke minst vil jeg takke min kjære forlovede Caroline Nguyen, min yngre bror, far og mor, samt resten av familie og venner for tålmodighet, støtte og omtanke gjennom hele arbeidet med masteroppgaven.

Oslo, mai 2012

Luan Minh Nguyen

Forkortelser

^1H NMR	^1H kjernemagnetisk resonans
^{13}C NMR	^{13}C kjernemagnetisk resonans
AEP	asparaginyln endopeptidase
Ala	alanin
Asn	asparagin
Bcl-2	B-celle lymfoma 2
Boc	<i>tert</i> -butyloksykarbonyl
Boc ₂ O	boc anhydrid, di- <i>tert</i> -butyldikarbonat
Brine	mettet natriumklorid, NaCl-løsning
C-terminal	karboksylsyre terminal ende
DCM	diklormetan, CH ₂ Cl ₂
CID	kollisjon indusert dissosiasjon
COMU	(1-cyano-2-etoksy-2-oxoetylidaminooksy)dimetylamino-morpholino carbeniumheksafluorofosfat
COSY	^1H todimensjonal korrelasjonsspektroskopi
DA	dalton
DMAP	4-dimetylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoksid
δ-verdi	kjemisk skiftverdi i ppm (parts per million)
EDC	<i>N</i> -(3-dimetylaminopropyl)- <i>N'</i> -etylkarbodiimid
ESI	elektronspray ionisering
Et ₃ N	trietylamin
EtOAc	etylacetat
EtOH	etanol
eq	ekvivalent
FON	fluor-, oksygen- og nitrogen-hydrogenbinding
Fmoc	9-fluorenylmetyl kloroformat
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyluronium heksafluorofosfat
HCl	saltsyre

HEK	Human embryonale nyreceller 293
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hydroksybenzotriazol hydrat
HPLC	væskekromatografi
IR	infrarød stråling
J	koblingskonstant
LC ₅₀	dødelig konsentrasjon, konsentrasjon som gir 50 % dødelighet
LC-MS	væskekromatografi med massespektroskopi
MeCN	acetonitrill
MeOH	metanol
MgSO ₄	magnesiumsulfat
MHz	megahertz
MMP	matriks metalloproteinase
MS	massespektroskopi
MTS	(3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-carboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium)
m/z	masse per ladning
NADH	nikotinamid adenindinukleotid
NADPH	nikotinamid adenindinukleotidfosfat
NaHCO ₃	natriumhydrogenkarbonat
NMM	<i>N</i> -metylmorfolin
OEt	etylester
OXYMA	etyl(hydroksiimino)cyanoacetat
psi	pund per kvadrattomme, 1 psi = 0.0689475729 bar
RT	retensjonstid
SOCl ₂	tionylklorid
TPEN	<i>N,N,N,N'</i> -tetrakis (2-pyridylmetyl)etylenediamin
UV	ultrafiolett stråling
Val	valin

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Legumain	1
1.2	Prodrug	1
1.3	Konsept	2
1.4	Biologisk evaluering	5
2	Peptidkobling og syntese	7
2.1	Aminosyrer og peptider	7
2.2	Generelt om peptidkobling	7
2.3	Aktuelle og tilgjengelige koblingsreagenser	8
2.3.1	EDC	8
2.3.2	HOBt	9
2.3.3	COMU og Oxyma	11
2.4	Aktuelle peptidbeskyttelsesgrupper	12
2.4.1	C-terminal: Eylester	12
2.4.2	N-terminal: Fmoc og Boc	13
2.5	Deacetylcolchicin	14
2.6	Ravsyre	15
3	Biologisk evaluering	16
3.1	<i>In vitro</i> evaluering av spaltnings spesifisitet av prodrug med legumain	16
3.2	<i>In vitro</i> evaluering av cytotoxisk aktivitet av prodrug med cellelinjer som uttrykker legumain	17
4	Resultater og diskusjon	19
5	Konklusjon	29
6	Videre arbeid	30
7	Eksperimentelt	31
7.1	Materiale og apparatur	31
7.1.1	Kjemikalier	31
7.1.2	Tynnsjikt kromatografi (TLC)	31
7.1.3	Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR)	31
7.1.4	Væskerkromatografi og massespektroskopi (LC-MS)	31
7.1.5	Preparativ HPLC	32

7.2	Syntese av forbindelse 2 (1-2).....	32
7.3	Syntese av forbindelse 3 (2-3).....	33
7.4	Syntese av forbindelse 4 (3-4).....	35
7.5	Syntese av forbindelse 5 (4-5).....	36
7.6	Syntese av forbindelse 6.....	38
7.7	Syntese av forbindelse 7 (6-7).....	38
7.8	Syntese av forbindelse 8 (7-8).....	39
7.9	Syntese av forbindelse 9 (8-9).....	40
7.10	Syntese av forbindelse 10 (9-10).....	41
7.11	Syntese av forbindelse 11 (10-11).....	43
7.12	Syntese av forbindelse 12 (11-12).....	44
7.13	Syntese av forbindelse 13 (12-13).....	45
7.14	Syntese av forbindelse 14 (13-14).....	46
7.15	Syntese av forbindelse 15 (11-15).....	47
7.16	<i>In vitro</i> eksperiment av spaltning av prodrug.....	48
Litteraturliste		50
Vedlegg		53

1 Introduksjon

1.1 Legumain

Mikromiljøet i og rundt tumor er beriket med et bredt spektrum av ulike proteaser der legumain er en forholdsvis nyoppdaget cysteinprotease. Enzymet ble først identifisert i planteriket og er senere også blitt funnet uttrykt hos pattedyr inkludert mennesker.

Navnet legumain, fra engelsk; *legume* eller latin; *legumen*, er navnet på belgplanter og dets frukt og frø der enzymet først ble isolert fra (Chen et al. 1997; Wu et al. 2006).

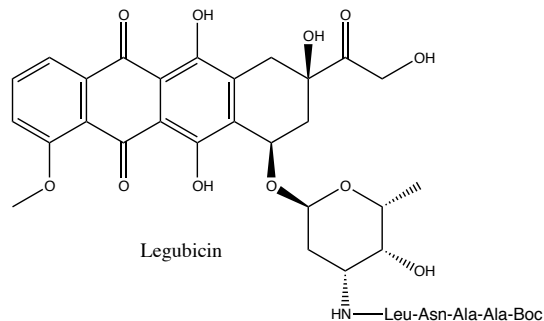
I friske vev i menneskekroppen er legumain kun detekterbar i små mengder i lever, nyre og milt. Enzymet er derimot sterkt overuttrykt i flere typer solide tumorer som i blant annet bryst, kolon og prostata. Enzymet er ikke tilstede ekstracellulært bortsett fra i tumor og i mikromiljøet rundt. Legumain er overuttrykt i makrofager, celleoverflater og vesikkelmembraner i cytoplasma til solide tumor. Aktivert legumain har en viktig rolle i nedgradering av ekstracellulær matriks. Høy konsentrasjon av enzymet har vist sammenheng med økt angiogenese, migrasjon, invasjon og metastase i kreftutvikling. Overuttrykt legumain relateres derfor til dårlig differensial prognose (Bajjuri et al. 2011; Gawenda et al. 2007; Lui et al. 2003; Murthy et al. 2005).

Legumain-ekspresjon blir induisert ved hypoksiske forhold i tumormiljøet. Enzymet eksisterer som inaktivt proenzym på 56 kDA nær nøytral pH. Aktivt enzym på 46 kDA dannes ved mildt sure forhold rundt pH 4,5 (Liu 2008; Chen et al. 2000). Legumain svært spesifikt i motsetning til andre kjente lysosomale endopeptidaser som viser en bredspektret kløyvingsaktivitet. Både plante- og pattedyrs legumain har vist seg å være asparaginyll endopeptidaser (AEP) som spalter peptider spesifikt C-terminalt ved asparagin. Denne kombinasjonen av enzymatisk uttrykks- og kløyvingsselektivitet gjør legumain til et meget interessant legemiddelmål både for tumoravbildning, enzymatisk aktivitetregulering og enzymatisk prodrugaktivering (Bajjuri et al. 2011; Chen et al. 1997; Gawenda et al. 2007; Liu et al. 2003; Müntz et al. 2002).

1.2 Prodrug

I litteraturen er prodrug som blir aktivert av legumain blitt testet av flere grupper. Dolastatin og dets syntetiske analog aurostatin E ble senest i 2011 koblet med et syntetisk AEP-peptidsubstrat og testet som prodrug for å selektivt hemme tumorvekst og metastase. Både dolastatin og aurostatin E viser subnanomolar cytotoxisitet mot mange humane kreftcellerlinjer. Forbindelsene er over tusen ganger mer potent enn andre legemiddelforbindelser, inkludert taxol og doxorubicin. Et prodrug er derfor ønskelig for å redusere toksisitet i friske celler (Bajjuri et al. 2011).

En av de mest kjente legumainsubstrat-prodrug-forbindelsene i litteraturen er legubicin (se **figur 1.2**). Legubicin er et prodrug av kreftlegemiddelet doxorubicin som i dag benyttes til å behandle et bredt spekter av ulike kreftformer. Legubicin ble godt tolerert i *in vivo*-modeller med redusert toksisitet sammenlignet med doxorubicin. Legubicin førte til apoptose tumorcelle og påvirket ikke celler i organer med kjent fysiologisk legumainkonsentrasjon som nyre og lever. Videre har legubicin gitt cytostatisk effekt etter administrering i ulike typer svulster inkludert multilegemiddel-resistente tumor *in vivo* (Gawenda et al. 2007; Lui et al. 2003; Wu et al. 2006).



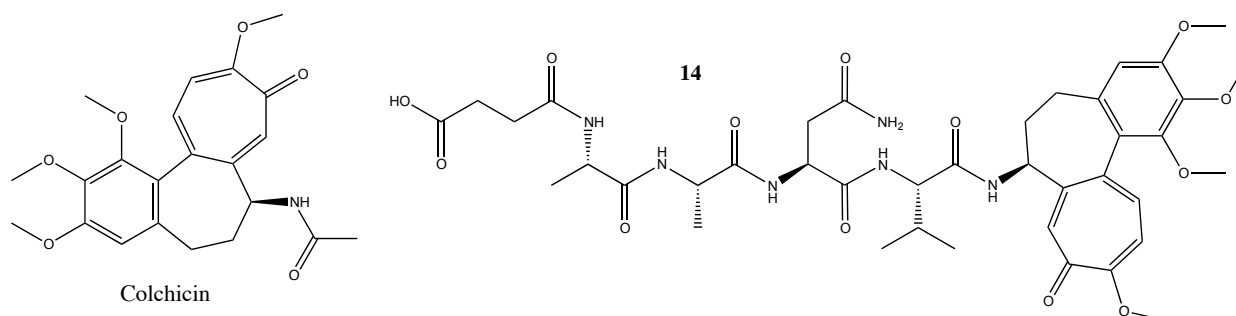
Figur 1.2. Legubicin, et godt evaluert doxorubicin-AEP-substrat-prodrug i litteraturen.

1.3 Konsept

Målet med oppgaven var å syntetisere et prodrug av colchicin- og en sinkchelator med et legumain-substrat for å oppnå selektiv hemming av tumorvekst.

Kolkisin (Felleskatalogen), kolchicin eller colchicin (Store Norske Leksikon), er det norske navnet på plantaalkaloidsubstansen som på engelsk betegnes; *colchicine* (se **figur 1.3.A**). Alkaloidet er ekstremt giftig og utvinnes ifra planten *Colchicum autumnale*. Medisinsk brukes colchicintabletter mot ulike former for gikt der behandlingen foretas under forsiktig

overvåkning. Colchicin er en av de sterkeste kjente mikrotubulihemmere og inhiberer celledeling svært effektivt.



Figur 1.3.A. Colchicin og forbindelse 14.

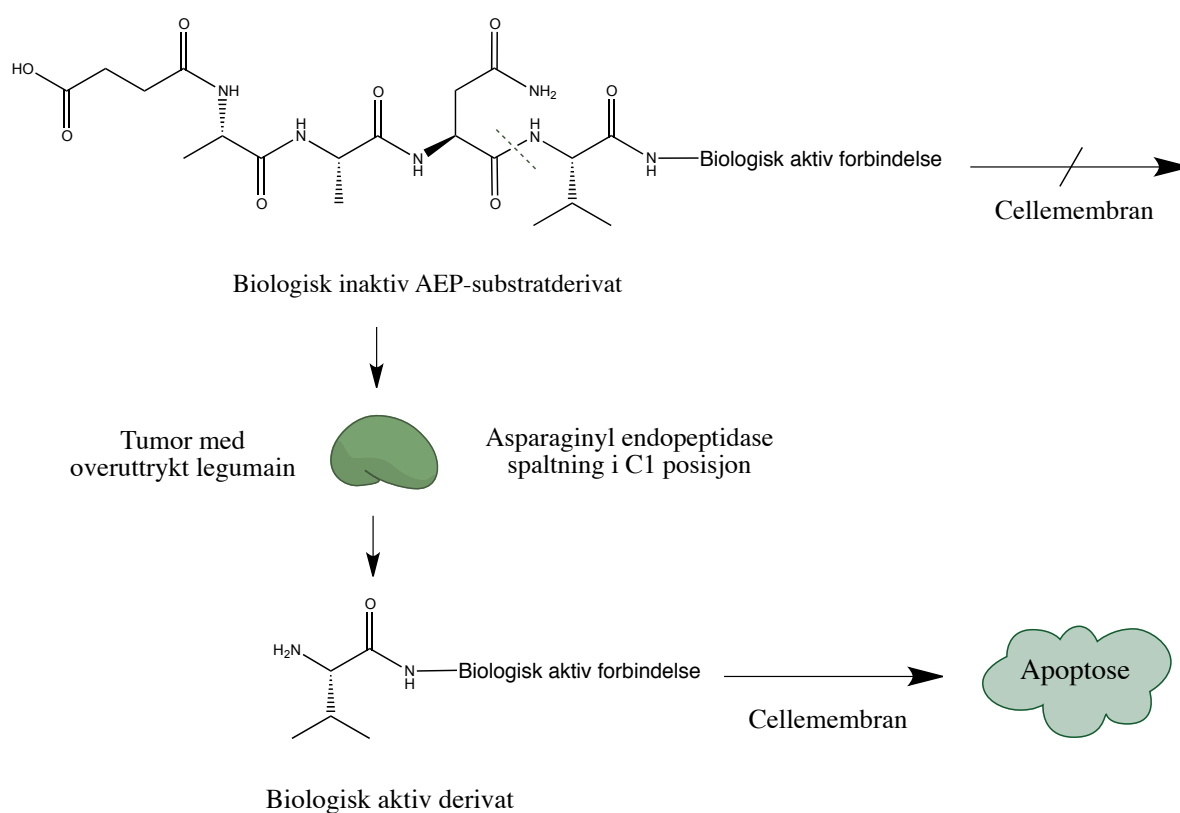
Colchicin inhiberer mikrotubuli-polymerisering ved å binde tubulin som er en av de viktigste subenhetene i mikrotubuli. Binding av tubulin inhiberer dannelse av protofilamenter som er større trådenheter bestående av tubulin. Tubulin og dannelsen av protofilamenter er essensiell for polymerisering av mikrotubuli og mitoseprosessen. Ved å binde tubulin fungerer colchicin som mitoksisisk-gift og hemmer mitose i kreftceller som friske celler (Samuelsson og Bohlin 2009). Den dødelige konsentrasjonen for colchicin i menneske, LC_{50} er 65 nM (Sjöström et al. 2008). Det anses av den grunn for giftig for å benyttes for å hemme tumorvekst i mennesker. Syntese av et prodrug som er substrat for AEP slik som forbindelse 14 vil kunne gi legumainprotease-aktivering og selektiv hemming av tumorvekst med redusert toksisitet ovenfor friske celler (se figur 1.3.B).

Sink er et grunnstoff i gruppe 12 i det periodiske system. Det har kjemisk symbol Zn, atomnummer 30, relativ masse 65,38 g/mol og oksidasjonstall II (Zn^{2+}). Fysiologisk er sink et nødvendig grunnstoff i essensielle livsprosesser. Menneskekroppen inneholder 2-4 g sink og det daglige behovet er rundt 20 mg (Kofstad og Pedersen 1997). Sink inngår i mange flere hundre enzymer som kofaktor og er essensiell for celleprolifisering og mange cellulære metabolske prosesser. Blant annet inngår det i degradering av ekstracellulær matriks ved ulike MMP sink-avhengige endopeptidaser og dermed tilrettelegging for angiogenese, fri radikalmetabolisme, samt celledødaktivering ved apoptose. Senere forskning tyder på at både forhøyet og redusert sinknivå er assosiert med kreftutvikling. I de senere årene har forskningsinteressen rundt lipofile sinkchelaterende forbindelser for å hemme tumorvekst vært stor. Godt beskrevet i litteraturen er TPEN, som binder intracellulær sink og aktiverer

caspase-kaskader som leder til apoptose (Bagley og Kerr 2002; Donadelli et al. 2008; Nakatani et al. 2000).

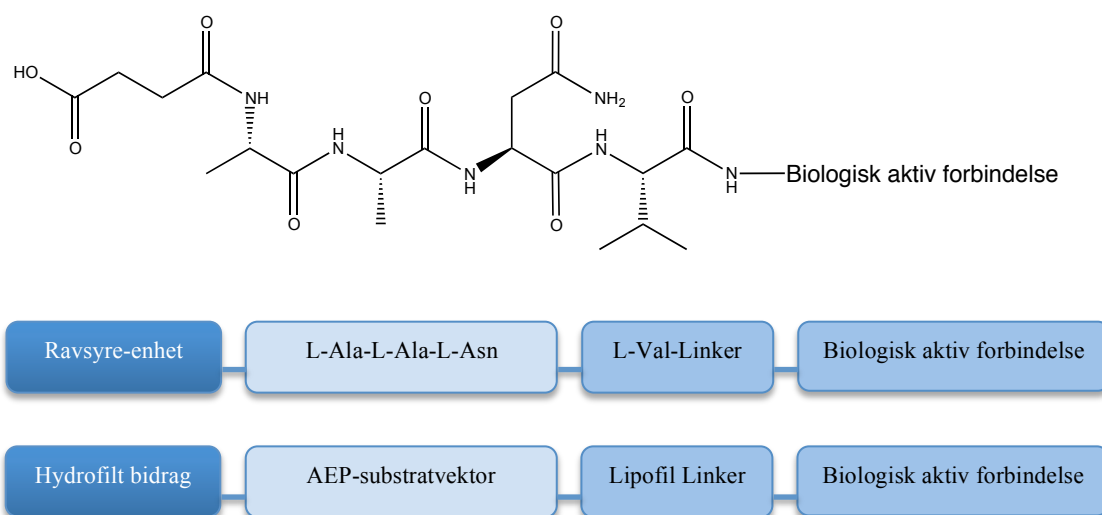
Kompleksing av intracellulær sink fører til en utrykksoppregulering av apoptotiske og antiapoptotiske Bcl-2 gener. Bcl-2 proteiner er blant annet involvert i nedreguleringen av transmembranpotensialet i mitokondrier som igjen induserer apoptose ved aktivering av caspase-3 og caspase-8. Det er også kjent at sink er med på å inhiberer caspase-3-aktivering. En direkte stimulering av caspase-3-aktivitet ved sink deplesjon vil kunne øke enzymaktiviteten og indusere celledød i tumorceller (Bagley og Kerr 2002; Donadelli et al. 2008).

Doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand, ved avdeling for farmasøytisk kjemi ved Universitetet i Oslo, har syntetisert en rekke lipofile sinkchelaterende forbindelser som mulige hemmere av tumorvekst. Ved å kombinere kunnskapen om legumainsubstrater og effektene av sinkchelatering og syntetisere forbindelse **17** kan selektiv hemming av tumorvekst muligens tilstrebes (se **figur 1.3.B**).



Figur 1.3.B. Legumain-protease aktivering av AEP-substrat-prodrug.

Som beskrevet i litteraturen ble både aurisatatin E og doxorubicin koblet til en alanin-alanin-asparagin-peptidvektor for å tilstrebe ønsket AEP-substrategenskaper (Bajjuri et al. 2011; Lui et al. 2003; Wu et al. 2006). I oppgaven ble det valgt å benytte samme peptidsekvens (se **figur 1.3.C**). Valin ble valgt som linker mellom peptidvektor og biologiskaktiv forbindelse for å få frigjøring av en mer lipofil derivat etter enzymspalting. Dette vil kunne bidra til økt cellemembrangjennomstrømming. For å oppnå nærmest mulig fysiologisk likhet har det blitt benyttet den naturlige L-isomeren av alle aminosyrer i syntesearbeidet. En ravsyre enhet ble koblet til det frie aminet i alanin i peptidvektoren for å øke vannløselighet. Økt prodrug vannløselighet vil blant annet redusere akkumulering av prodrug i friske celler (se **figur 1.3.C** og **1.3.B**).



Figur 1.3.C. Ala-Ala-Asn peptidvektor med ravsyre-enhet og Val-linker til biologiskaktiv forbindelse, biologisk aktiv forbindelse = 1. Colchicin eller 2. Sinkchelaterende forbindelse.

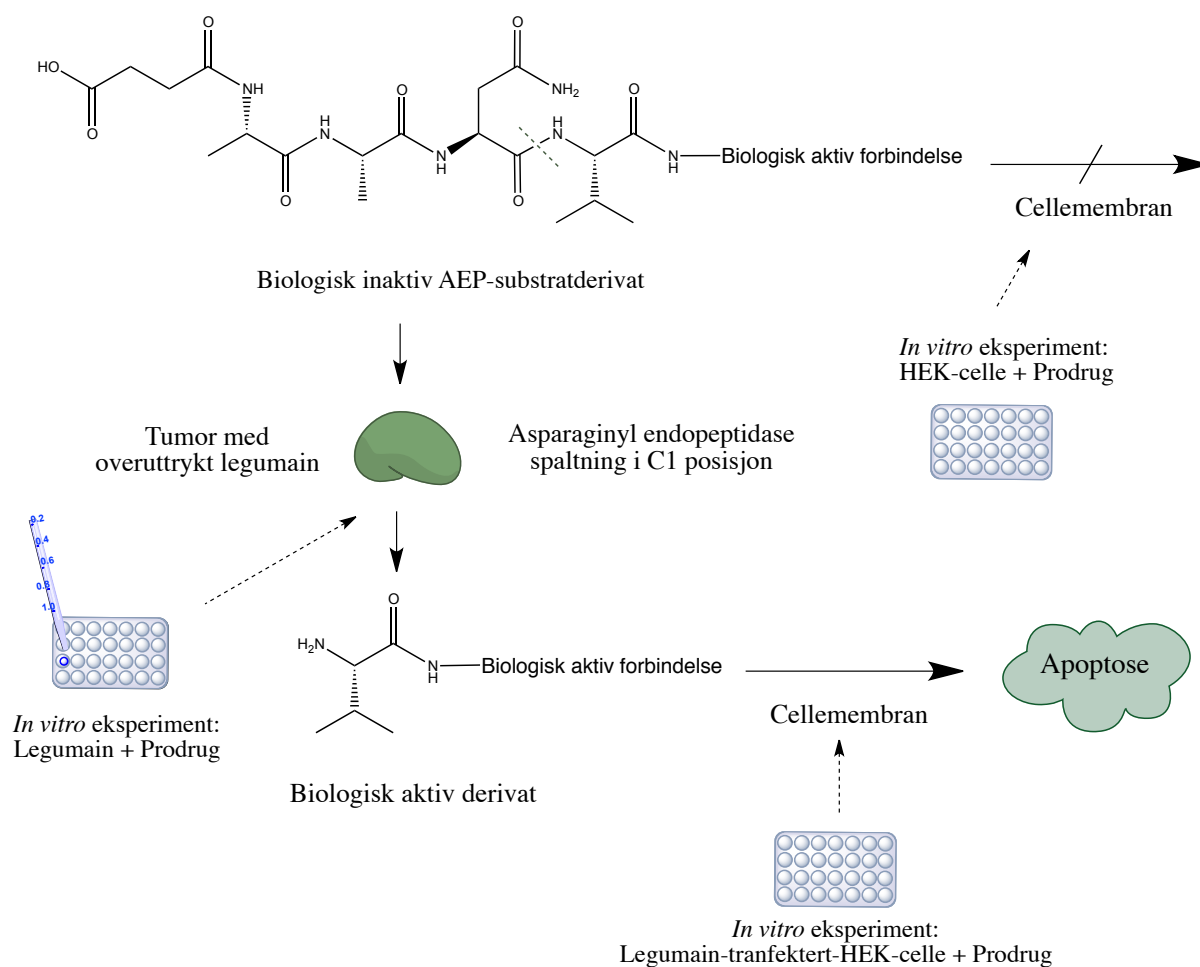
Hovedideen bak konseptet er altså å potensielt oppnå høyere selektivitet mot tumor celler med overuttrykt legumain og mindre toksisitet i friske celler (se **figur 1.3.B**).

1.4 Biologisk evaluering

Biologisk evaluering av synteseproduktene ved bruk av ulike assay er utført ved protease-gruppen, ProTarg ved Farmasøytisk Institutt med Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen. Både professor Harald Thidemann Johansen og professor Rigmor Solberg i forskningsgruppen ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap har lang forskningserfaring innenfor proteolytiske enzymer, herunder cysteinproteaser som legumain.

ProTarg har rene ekstrakter av enzymet legumain. Dette gir mulighet for å se på hvordan legumain spalter prodrugene *in vitro* og bevise konseptets første trinn der prodrugene spaltes til en aktiv biologisk forbindelse (se **figur 1.4**).

Videre har gruppen også stabile legumain-transfektete HEK-cellelinjer tilgjengelig. Dermed er det satt opp *in vitro* eksperimenter for å analysere prodrugenes cytotoksiske aktivitet på henholdsvis normale HEK-celler uten spesiell legumainaktivitet, og celler som overuttrykker legumain (se **figur 1.4**).



Figur 1.4. *In vitro* eksperimenter med prodrug, legumain, HEK- og legumain-transfektet-HEK.

2 Peptidkobling og syntese

2.1 Aminosyrer og peptider

Aminosyrer er grunnelementer i proteiner og inngår av den grunn som byggesteiner samtidig som de er med på å regulere et utall fysiologiske prosesser i alle levende celler. I sin enkleste form er aminosyrer en stabil amfotær organisk forbindelse bestående av en aminoenhet og en karboksylsyreenhet. Den viktigste gruppen aminosyrer er α -aminosyregruppen der aminogruppen og karboksylgruppen er bundet til ett og samme karbonatom, α karbonatomet (Kierulf 2011; Solomons og Fryhle 2009).

Dannelse av aminosyrer er et essensielt trinn i utviklingen av alt liv. Neste grunnleggende trinn er sammenkobling av aminosyrer til peptider og videre til polypeptider og proteiner. Proteiner kan videre danne enzymer og dets substrater. Et peptid er en forbindelse der α -aminosyrer er koblet sammen ved amidbinding eller peptidbinding. Flere sammenkoblede aminosyrer får henholdsvis betegnelsene dipeptider, tripeptider, oligopeptider (3-10) og polypeptider (> 10). Proteiner er flerkjedede polypeptider og får betegnelsene primære-, sekundære-, tertiære- eller kvarternære, alt ut ifra hvor komplisert den romlige strukturen til proteinet er. Enzymer er makroproteiner som katalyserer et stort antall kjemiske prosessene i alle levende organismer. I naturen dannes peptider og proteiner i levende celler ved informasjon fra arvematerialet. I dag kan slike forenklede synteser utføres på laboratoriet. Større kompliserte polypeptider og proteiner dannes ved bruk av automatisert fastfase peptidsyntese, SPPS eller ved rekombinant genteknologi (Kierulf 2011; Solomons og Fryhle 2009).

2.2 Generelt om peptidkobling

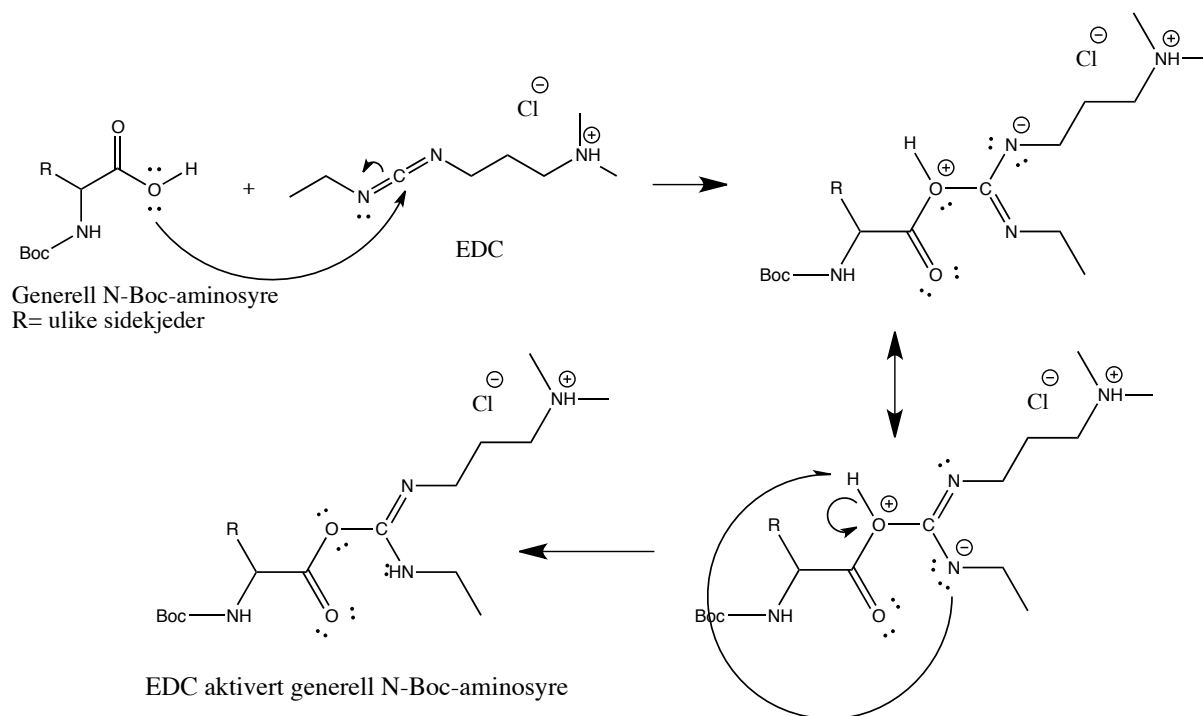
Amidbinding av aminosyrer og peptider er sin enkleste form bekvemmelig kjemi. Det finnes mange anvendbare metoder og det er blitt utført mye forskning på å finne frem til praktiske metoder for enkel peptidsyntese. I dag benyttes amidpromoterende reagenser som aktiverer karbonylgruppen av typen dialkylkarbodiimidforbindelser som EDC med gode resultater. Andre reagenser som ofte benyttes for å promotere peptidkoblinger er benzotriazoler som HOAt og HOBt. Videre er også Oxyma og COMU blitt utviklet og benyttet med gode resultater. Peptidkobling kan være litt problematisk da aminosyrer og peptider kan reagere og

koble med seg selv, omleire og polymerisere. Amidbindingskjemi blir vesentlig mer komplisert når det skal utføres på lengre polypeptider der molekylet i tillegg til å kunne reagere med seg selv, også har flere enn en C-terminal og N-terminal ende. I slike tilfeller er det en stor utfordring å kontrollere tilstrebet reaksjon. En løsning er blitt innføring av beskyttelsesgrupper. Felles for alle beskyttelsesgrupper er at de må kunne hindre uønskede grupper å reagere videre i amidpromoterende betingelser samtidig som at de enkelt må kunne fjernes ved betingelser som ikke påvirker nydannede peptidbindinger og resterende beskyttelsesgrupper. I tillegg bør beskyttelsesgruppene harmonere løseligheten i de mest vanlige peptidkoblingsløsemidlene. Sist og ikke minst bør fjerning av beskyttelsesgruppene også være rask, effektiv og fri for sidereaksjoner (Isidro-Llobet 2009).

2.3 Aktuelle og tilgjengelige koblingsreagenser

2.3.1 EDC

Til i dag er carbodiimidmediert peptidkobling en av de mest anvendte metodene (se **skjema 2.3.1** for aktiveringsmekanisme).

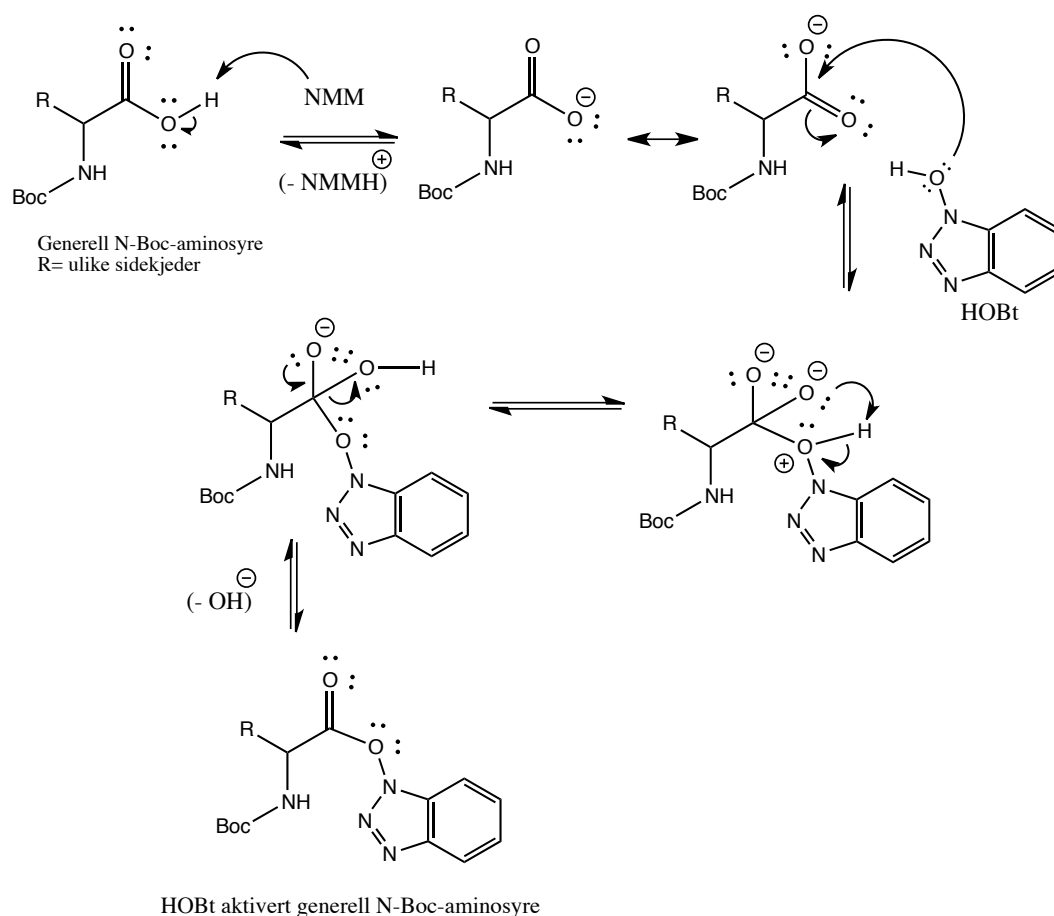


Skjema 2.3.1. Antatt EDC aktiveringsmekanisme.

En fordel med carbodiimider som EDC er at det ikke er avhengig av forhåndsaktivering av karboksylsyregruppen. Og det at det er vannløselig slikt at det enkelt kan ekstraheres ut i vannfasen gir det en stor fordel som koblingsreagens. En annen fordel er EDC kan benyttes til å utføre koblinger i vandige eller alkoholholdige løsemidler (Williams og Ibrahim 1981). Et problem med carbodiimider er at de er for reaktive og at de dermed kan forårsake racemisering (Caprino 1993).

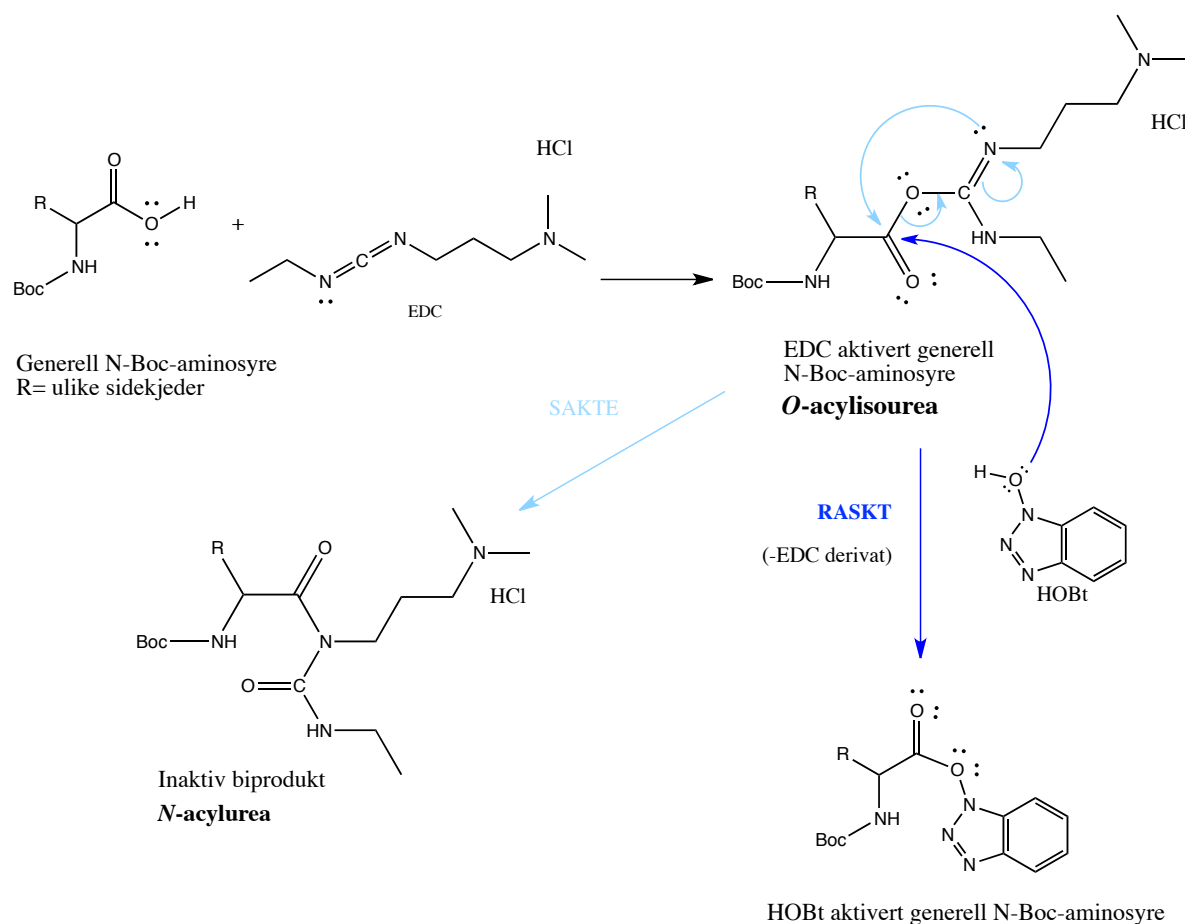
2.3.2 HOBt

Et annet vanlig peptidkoblingsreagens er HOBt (se **skjema 2.3.2.A** for aktiveringsmekanisme). HOBt benyttes enten frittstående eller i kombinasjon med carbodiimider eller andre koblingsreagenser (Caprino 1993). Bruken av carbodiimid som enkelreagenser og andre esterteknikker er gradvis blitt erstattet med HOBt eller uroniumsalter basert på HOBt som gir mindre racemisering (Li og Xu 2000).



Skjema 2.3.2.A. Antatt HOBt aktiveringsmekanisme.

HOBt i kombinasjon med EDC gir redusert racemisering og acetyl dannelse av det ureaktive *N*-acylurea ved å reagere raskere som nukleofil og utkonkurrere biproduktdannelse samtidig som det danner et intermediat som fortsatt er reaktiv nok til å koble med aminer, se **skjema 2.3.2.B** (Montalbetti og Falque 2005).



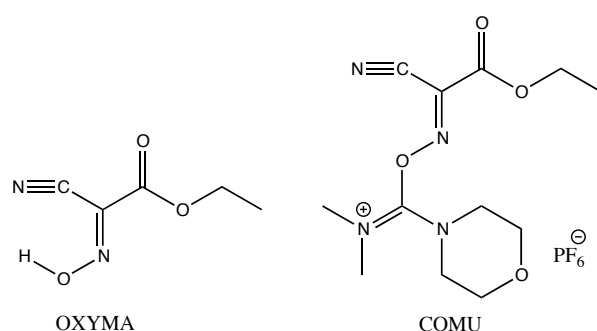
Skjema 2.3.2.B. EDC og HOBt aktiveringsmekanisme, samt inaktiveringsmekanisme til *N*-acylurea biprodukt.

HOAt er også mye anvendt. HOAt er tilsvarende HOBt med en pyridin- istedenfor en benzenenhet. Dette har vist å gi ytterligere stabilisering mot racemisering ved nabo FON-bindingseffekt (Caprino 1993).

En stor ulempe med triazolene er at de er høyst eksplosive. HOBt er stabil i monohydrat form, men meget eksplosivt som anhydrat (Subiros-Funosas et al. 2009). På grunn av eksplosjonsfare er det få aktører på markedet i dag som vil lagre og frakte HOBt. Til tross for faren viser det seg at institusjoner som har HOBt tilgjengelig fortsatt benytter HOBt kombinasjon med EDC, men da med stor forsiktighet.

2.3.3 COMU og Oxyma

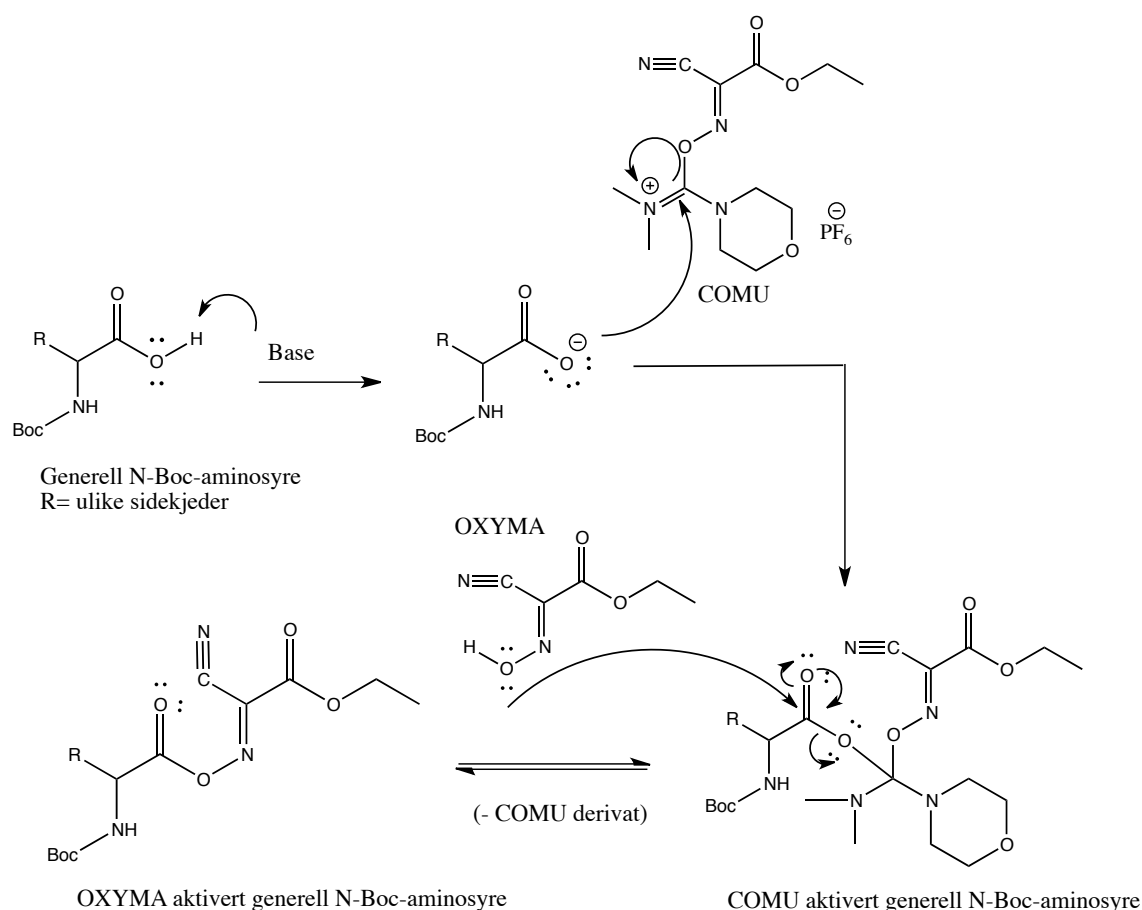
På grunn av eksplosjonsfaren ved bruk av HOBt og HOAt og deres derivater har forskningsgrupper, slik som Albericio-gruppen i Spania og El-Faham-gruppen i Egypt, jobbet med å forbedre disse reagensene. Nye funn viser at innlemmelse av en hydrogenbindingsakseptor i iminiumdelen av koblingsreagenten økte prestasjonen. Erstatning av en dimetylamino-enhet med en mer polar morpholin-gruppe gav også optimale forbedringer (El-Faham et al. 2009). Resultatet av arbeidet ble de nye koblingsreagensene Oxyma og COMU (se **figur 2.3.3**).



Figur 3.3.3. Struktur til OXYMA og COMU.

Direkte sammenligning mellom HOBt og HOAt og Oxyma viste at det nye koblingsreagentet var effektivt i å inhibere racemisering når det ble brukt sammen med carbodiimid-reagenser. Oxyma viste seg å være mer effektiv enn HOBt og minst like effektiv som HOAt samtidig som eksplosjonsfaren var eliminert (Subiros-Funosas et al. 2009).

COMU er uroniumsaltderivatet av Oxyma. COMU presterer ekstremt godt i nærvær av bare 1 eq base noe som bekrefter tilstedeværelse av en hydrogenbindingsakseptor i reaksjonen. Koblingsreagentet er konstruert ved å kombinere overnevnte effektiviserende funn. Forsøk viser at dets egenskaper overgår alle kjente guanidinium/uronium koblingsreagenser i effektivitet. COMU gir høy og rask koblingseffektivitet og viser veldig lav tendens til racemisering (se **skjema 2.3.3** for aktiveringsmekanisme for COMU og Oxyma). Andre fordeler er at det er lett løselig og stabilt i vanlige peptidkoblingsløsemidler som DMF. Biprodukter dannet ved COMU er vannløselige og kan ekstraheres ved en enkel separasjon. Koblingsreagentet kan også benyttes som reaksjonsindikator da det kan endre farge når reaksjonen er ferdig. Ikke minst er COMU med Oxyma-enheten ikke eksplosivt slik som triazolderivatene (El-Faham et al. 2009).



Skjema 2.3.3. Antatt COMU- og Oxyrna aktiveringsmekanisme.

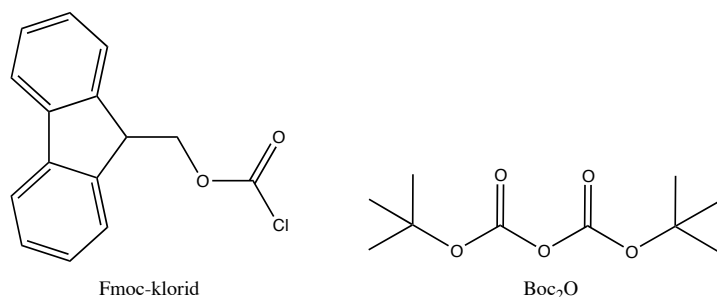
2.4 Aktuelle peptidbeskyttelsesgrupper

2.4.1 C-terminal: Etylester

Esterifisering er en av de vanligste metodene for å beskytte C-terminal ende i peptidkoblingskjemi i løsning. Som følge av utviklingen av nye metoder for peptidkobling har SPPS blitt den foretrekkende metoden med årene. Og ettersom det er C-terminal ende oftest festes til det faste materialet eksisterer det langt flere typer N-terminale beskyttelsesgrupper enn C-terminale. For syntese av mindre peptider i væskefase har det vært tilstrekkelig å benytte seg av esterifikasjon for å beskytte C-terminal ende. Metyl- og etyl esterifisering er både enkelt og rimelig. Det har liten påvirkning på løselighet i vanlige peptidkoblingsløsemidler og det påvirker forbindelsens krystallinske egenskaper lite. Resultatet er at mange aminosyrer i dag kan kjøpes til lav pris som estere. En annen stor fordel er at esterbeskyttelsesgrupper raskt og enkel kan fjernes ved moderate basiske betingelser med lut uten store farer for sidereaksjoner (Solomons og Fryhle 2009).

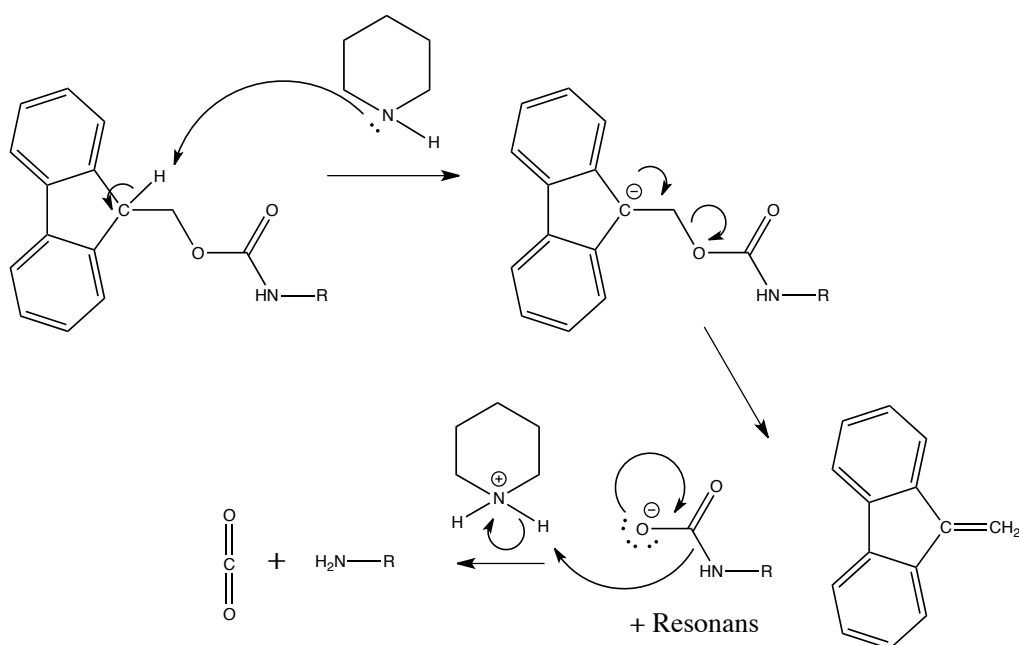
2.4.2 N-terminal: Fmoc og Boc

N-terminal-aminogruppe beskyttes ved å konvertere gruppen til en annen forbindelse med lav nukleofilisitet som ikke vil reagere med acylderivater. Eksempler på reagenser som ofte benyttes er Boc- og Fmoc-beskyttelsesgrupper (se **figur 2.4.2**). Fmoc og Boc er populære da de både kan benyttes i fastfase- og væskefase peptidsyntese (Isidro-Llobet 2009; Solomons og Fryhle 2009).



Figur 2.4.2. Struktur til Fmoc-klorid og Boc₂O.

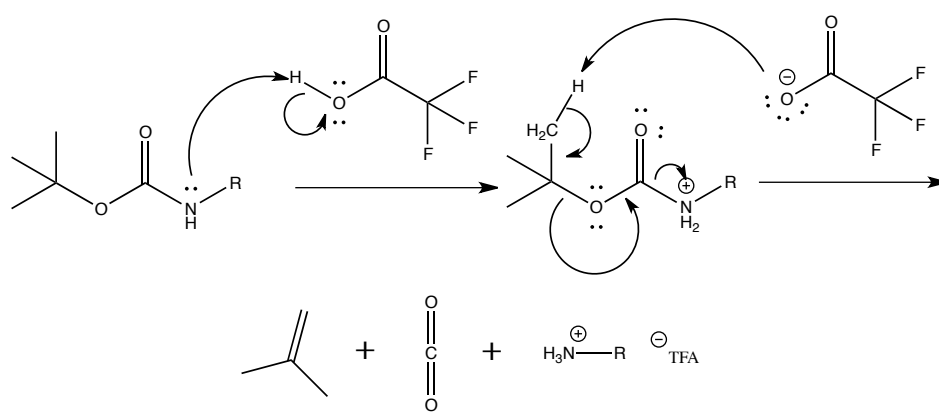
Fmoc er en syrestabil beskyttelsesgruppe. Beskyttelsesgruppen kan raskt og enkel fjernes med baser med lav nukleofilisitet i milde basiske betingelser i organiske peptidkoblingsløsemidler som DMF. Baser som ofte benyttes er piperidin og morfolin (se **skjema 2.4.2.A**).



Skjema 2.4.2.A. Avbeskyttelse av Fmoc.

En annen fordel er at Fmoc gruppen er godt synlig på UV noe som gjør beskytning og avbeskytning enkelt å detektere. Noen negative aspekter ved Fmoc er at beskyttelsesgruppen kan føre til lavere løselighet. Fmoc er heller ikke like kostnadseffektivt da det er dyrere og har større molekylvekt enn andre tilgjengelige beskyttelsesgrupper. Basisk avbeskytning krever dessuten et ekstra nøytraliseringstrinn (Isidro-Llobet 2009).

Boc er i motsetning til Fmoc en basestabil beskyttelsesgruppe. I tillegg er Boc også stabil mot nukloefiler og katalytisk hydrogenering. Den mest vanlige elimineringsbetingelsen for Boc er 20-50 % TFA i DCM (se skjema 2.4.2.B).

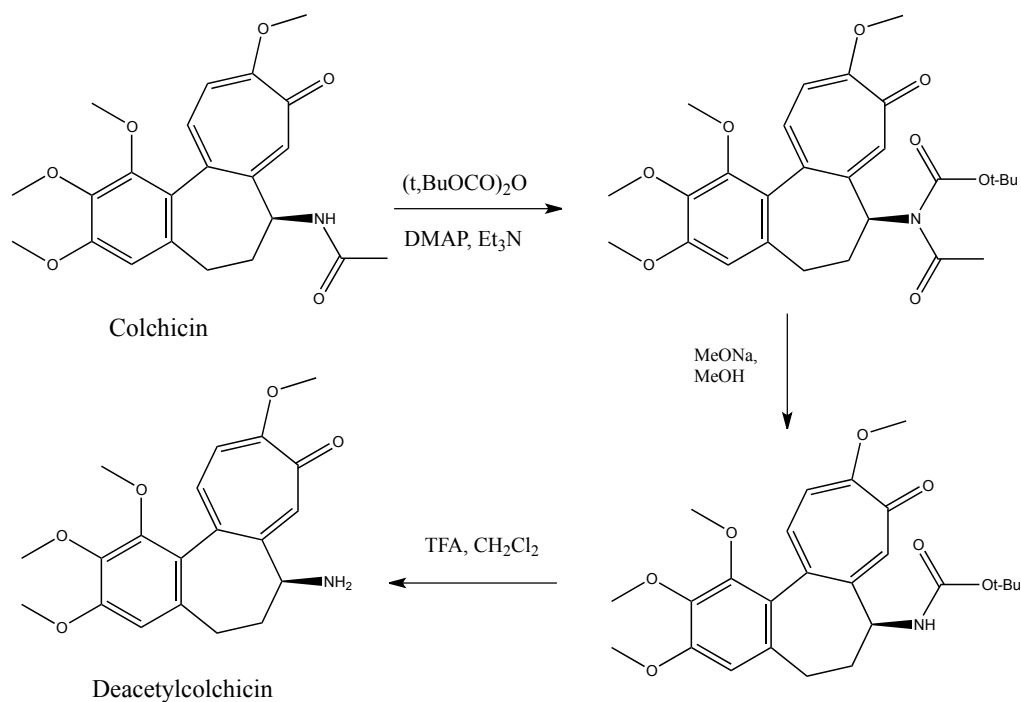


Skjema 2.4.2.B. Avbeskyttelse av Boc.

Avbeskyttelsesprosessen av både Boc og Fmoc drives av frigjøring av CO_2 (g) og er dermed irreversibel. Boc-beskyttede aminosyrer er ofte krystallinske og godt løselig i peptidkoblingsløsemidler. Generelt er det mer kostnadseffektivt å benytte Boc fremfor Fmoc, men sikkerhetsmessig anses Fmoc for å være noe tryggere enn Boc. Boc avbeskyttelse gir som regel TFA-salt som må opparbeides videre (Isidro-Llobet 2009).

2.5 Deacetylcolchicin

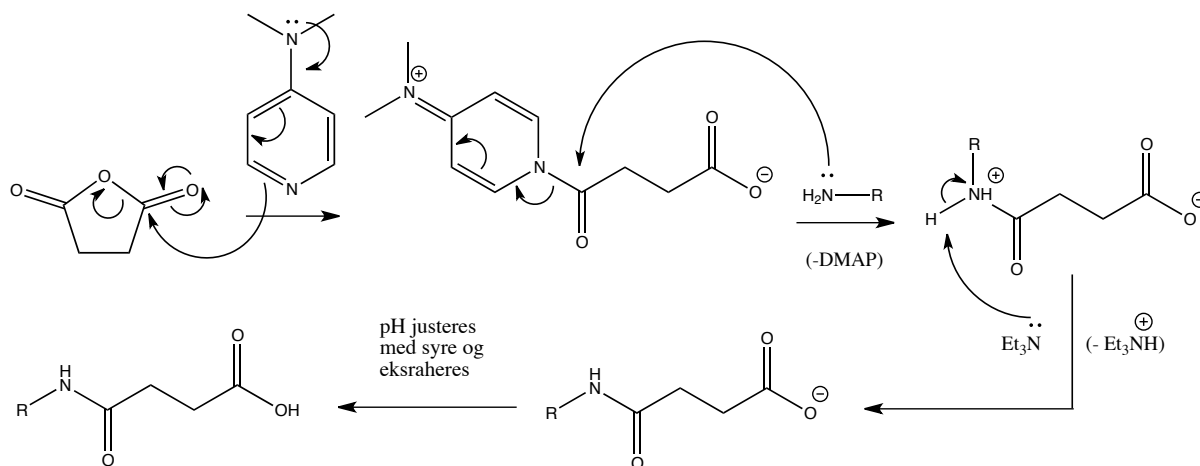
For å kunne amidbinde colchicin til peptidvektor må colchicin først deacetyleres til deacetylcolchicin. Metoden som inspirerte deacetyleringen (se **skjema 2.5**) ble hentet ifra artikkelen til gruppen til Lebeau ved Farmasøytisk Institutt ved Louis Pasteur Universitetet (Lebeau et al. 1997).



Skjema 2.5. Deactylering av colchicin til deacetylcolchicin (Lebeau et al. 1997).

2.6 Ravsyre

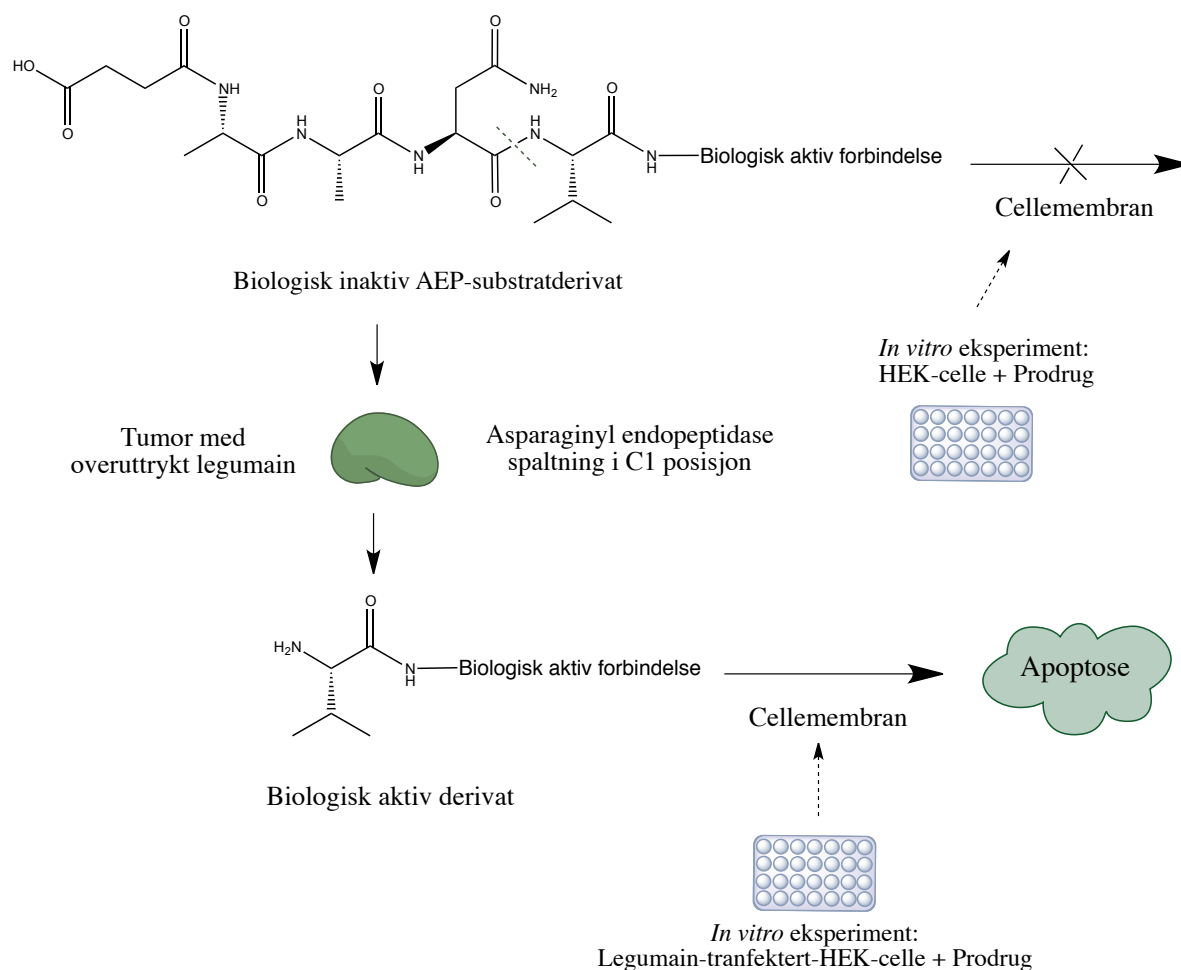
For å fullføre syntesen og for oppnå et mer vannløselig sluttprodukt ble en ravsyreanhydrid koblet med AEP-substratderivatet. I syntesen ble ravsyreanhydrid aktivert med katalytisk mengde DMAP. DCM ble brukt som løsemiddel for å løse opp peptidforbindelsen og Et_3N ble benyttet som base. Ravsyreanhydrid ble tilsatt i overskudd den første timen for å sikre produktdannelse (se **skjema 2.6**).



Skjema 2.6. Antatt mekanisme for amidkobling av ravsyreanhydrid til amin ved katalytisk mengde DMAP.

3.2 *In vitro* evaluering av cytotoksisk aktivitet av prodrug med cellelinjer som uttrykker legumain

For å evaluere den cytotoksiske aktiviteten av forbindelsene er det planlagt å foreta viabilitetsstudier i legumain-transfektete HEK-celler sammenlignet med utransfektete HEK-celler (se **figur 3.2**).



Figur 3.2. *In vitro* eksperimenter med HEK- og HEK-transfektete-celler.

HEK (Human Embryonic Kidney 293 cells) er en human cellelinje opprinnelig isolert ifra embryonale nyreceller. Bruken av HEK-celler er svært utbredt da cellene er veldig lette å jobbe med. HEK-celler er lette å dyrke og transfekteres svært enkelt (ATCC® database 2012). Legumain-transfektete HEK-celler er stabile HEK-transfektanter som overuttrykker legumain. Cellene er laget etter en liposom-mediert transfeksjonsmetode.

Det er planlagt å estimere den cytotoksiske aktiviteten med viabilitetsmåling ved hjelp av MTS-reagens og absorbansmåling. Metoden tar utgangspunkt i den metabolske aktiviteten i celler. Mer spesifikt reduksjonen av NADP^+ og NAD^+ til henholdsvis NADPH og NADH ved dehydrogenase. MTS er et kolorimetrisk-tetrazolium-reagens som benyttes for å direkte måle reduktase- og dehydrogenase-enzymaktivitet i celler. Indirekte kan det dermed benyttes til å måle celleviabilitet. Reduksjon av MTS-reagenset fører til farging av formazaner som er kunstig fargede kromogenprodukter av tetrazolium reduksjon til formazan. Absorbansmåling av formazan er direkte proporsjonal med antall levende celler. Metoden kan dermed benyttes til å måle cytotoksisk aktivitet av sluttprodukt **14** og **17** da disse vil kunne inhibere cellevekst og celleviabilitet (Promega® 2012). Viabilitetseksperimenter skal bli foretatt med prodrug og med valin-derivat av prodrug som kontroll, i HEK- og legumain transfektert HEK-celler.

4 Resultater og diskusjon

Syntesen av sluttprodukt **14** ble utført som vist i **skjema 4.A** og **4.B**. Syntesen av mellomprodukt **15** ble utført som vist i **skjema 4.C**, men videre opprensingsarbeid og videre synteser til sluttforbindelse **17** ble ikke utført på grunn av tidsbegrensninger i oppgaven. De utførte syntesene er analogt med prosedyrer beskrevet i forsøkene til Carpino (1993) og El-Faham og Albericio (2010) og etablerte metoder beskrevet av doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand, samt andre overnevnte metoder.

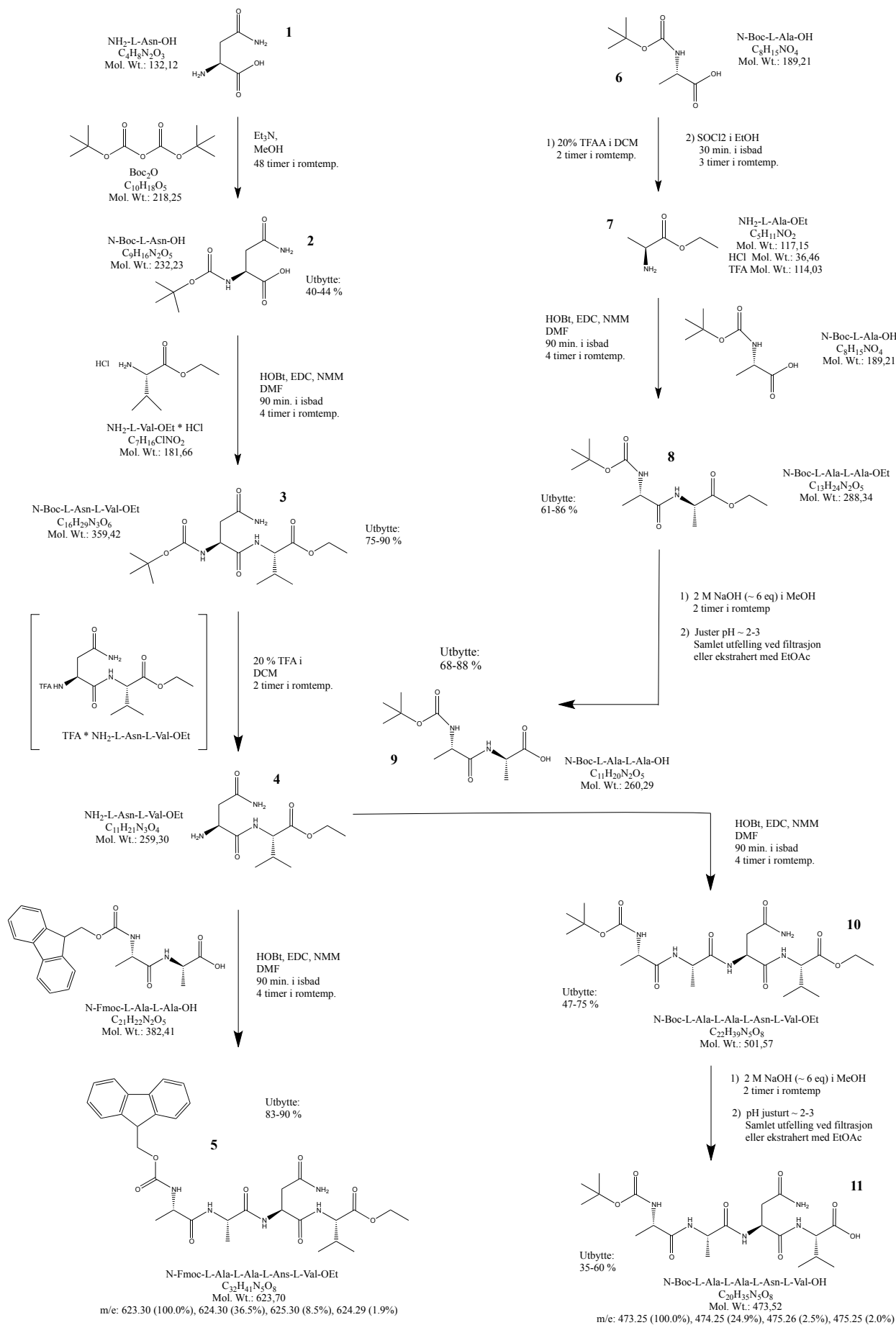
Etter vurdering ble EDC og HOBt benyttet for å peptidkoble aminosyrer og korte peptider i den tidlige prosessen av syntesearbeidet (syntese av forbindelse **2** til **9**, se **skjema 4.A**). COMU og Oxyma, som var tilgjengelig i mindre mengde, ble spart til å eksperimentere med i senere og mer kompliserte koblinger.

Synteser av forbindelse **2** til **9** ble utført med moderat til høyt utbytte og renhet (se **skjema 4.A**). Variasjoner i reaksjonstid på pluss en halv time til en time påvirket ikke reaksjonene. Ved syntese av forbindelse **7** ble det på grunn av et reagens urenhet dannet et gulaktig mellomprodukt som ikke lot seg vaske bort. Urenheten skyldes trolig gammel tionylklorid som ble benyttet i syntesen. Senere synteser av forbindelse **7** med renere tionylklorid-løsning eliminerte forurensningen. Videre utover i oppgaven ble forbindelse **7** kjøpt av tidsbesparende årsaker.

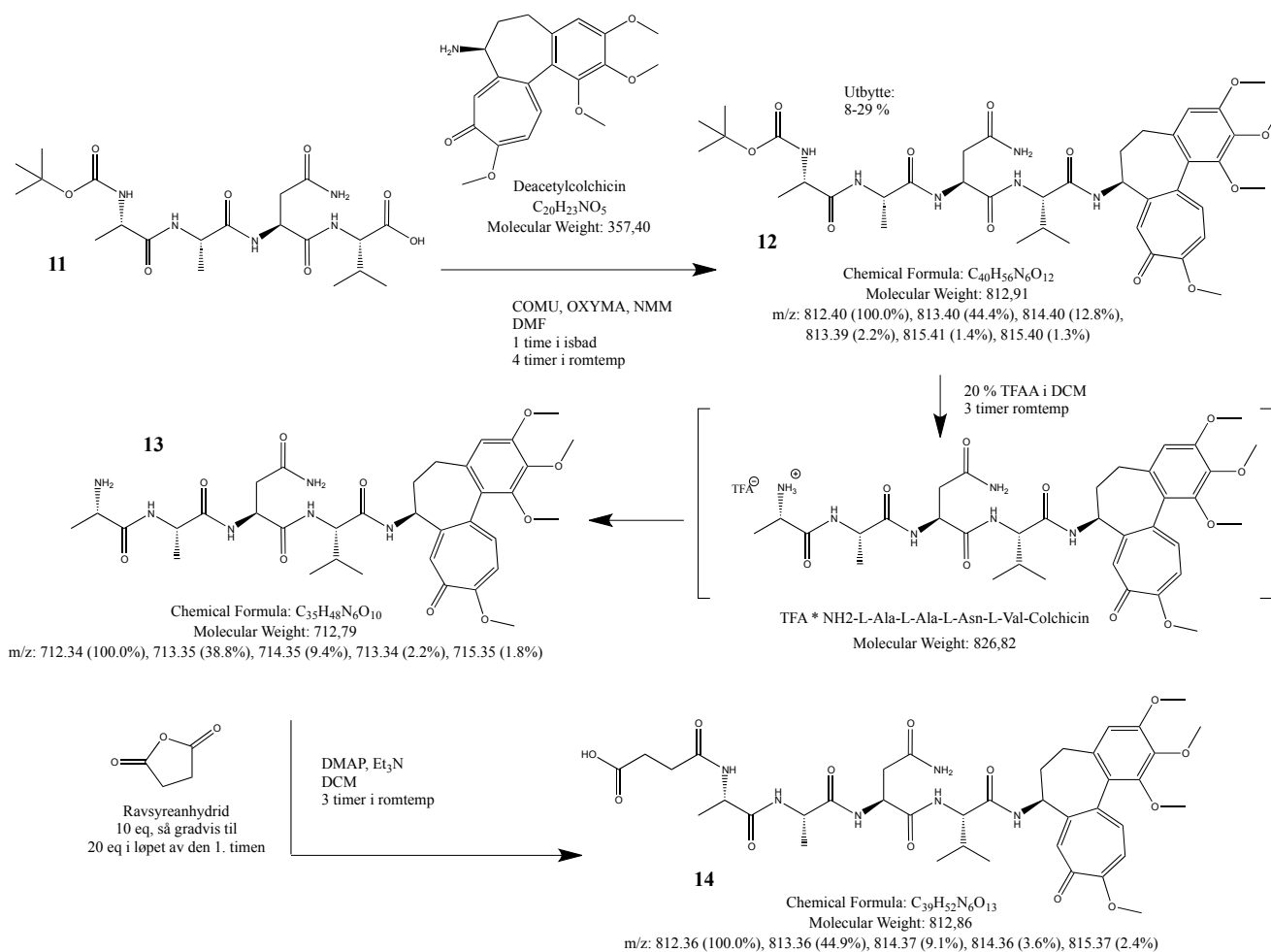
Ved sammenkobling av to peptider til en større peptidvektor, syntese av forbindelse **10** (se **skjema 4.A**), og sammenkobling av endelig peptidvektor og deacetylcolchicin, syntese av forbindelse **12** (se **skjema 4.B**), ble EDC og HOBt vurdert mot COMU og Oxyma. Det ble satt opp småskala synteseforsøk for syntese av forbindelse **10** og **12** med henholdsvis EDC-HOBt og COMU-Oxyma. COMU uten Oxyma ble også testet for syntesen av forbindelse **10** (se **tabell 4**).

Tabell 4. Synteseforsøk av forbindelse **10** (10-1 til 10-3) og forbindelse **12** (12-1 og 12-2).

Syntese	Koblingsreagenser	Løsemiddel	Reaksjonstid (timer)	Utbytte (%)	Kommentarer
10-1	EDC (1,2 eq), HOBt (1eq)	DMF	4	47-75	Enkel ekstraksjon
10-2	COMU (1,2 eq), OXYMA (1 eq)	DMF	4	30-83	Emulsjon v/ekstraksjon
10-3	COMU (1,2 eq)	DMF	4	57	Emulsjon v/ekstraksjon
Syntese	Koblingsreagenser	Løsemiddel	Reaksjonstid (timer)	Utbytte (%)	Kommentarer
12-1	EDC (1,2 eq), HOBt (1eq)	DMF	4	2-26	Enkel ekstraksjon
12-2	COMU (1,2 eq), OXYMA (1 eq)	DMF	4	10-36	Emulsjon v/ ekstraksjon



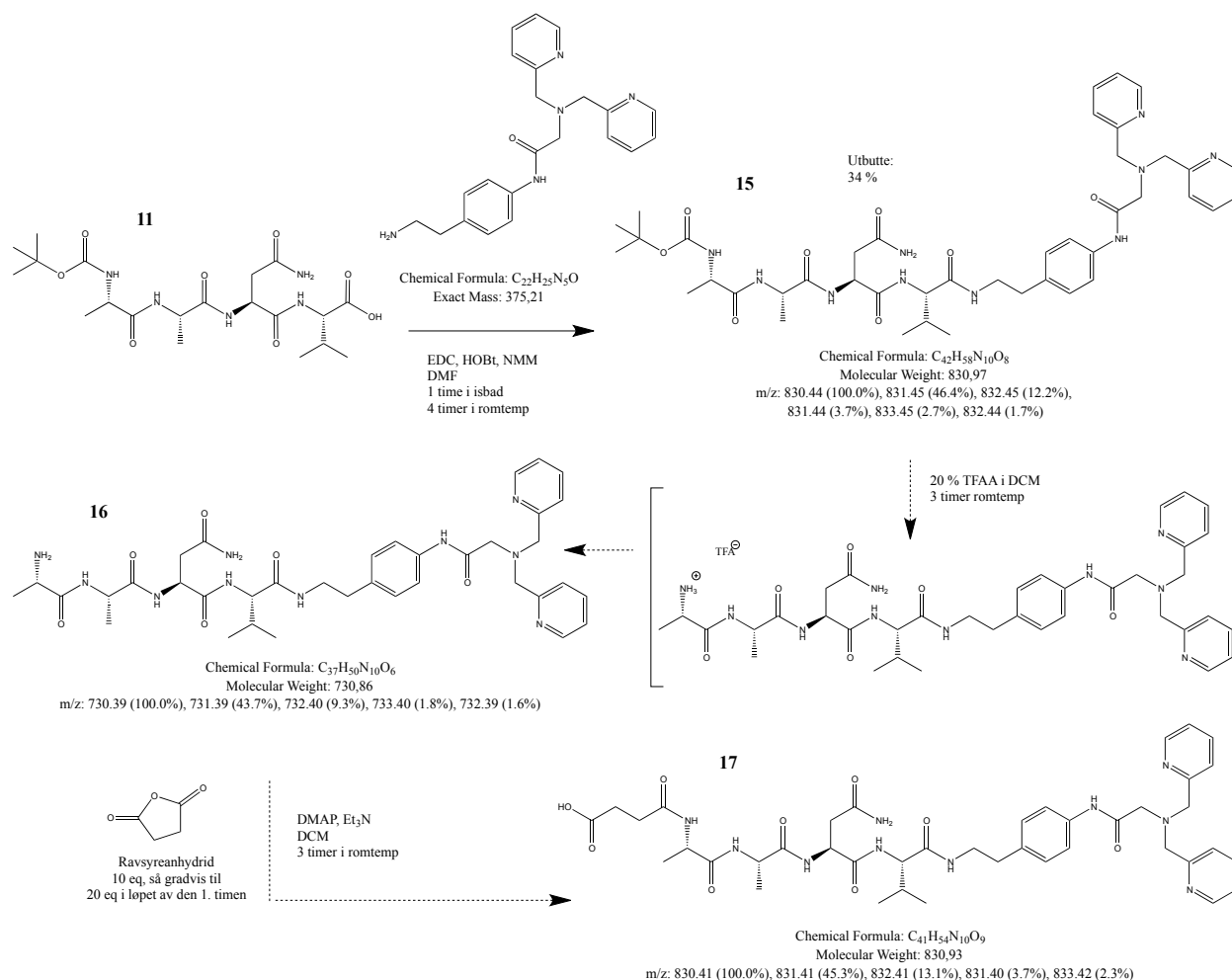
Skjema 4.A. Synteseskjema for syntese av Fmoc- og Boc-beskyttet AEP-substratvektor, forbindelse **5** og **11**.



Figur 4.B. Synteseskjema for syntese av colchicin-AEP-substrat, forbindelse **14**.

For syntese av forbindelse **10** gav COMU alene det laveste utbytte. COMU-Oxyma utbyttet ble noe høyere enn EDC-HOBt, men opparbeidelsen ved ekstraksjon ble vanskeligere da det ble dannet en gulaktig og kraftig emulsjon etter vask med $NaHCO_3$ - og $NaCl$ -løsning. Større synteseskala med større mengde peptidkoblingsreagenser gav verre emulsjoner og lavere utbytte. EDC med HOBt gav et jevnere og høyere utbytte under kobling til et relativt stort peptid i stor skala. For syntesen av forbindelse **10** ble det derfor valgt å fortsette å benytte EDC og HOBt.

Ved syntese av forbindelse **12** gav COMU-Oxyma et vesentlig høyere utbytte enn EDC-HOBt. Emulsjonproblematikken var den samme, men da syntese av forbindelse **12**, og lignende sammenkoblinger av peptidvektor og biologisk aktiv derivat ble gjort i mindre skala, ble COMU-Oxyma valgt for formålet i det videre syntesearbeidet (se **skjema 4.A** til **4.C** for synteseoversikt).

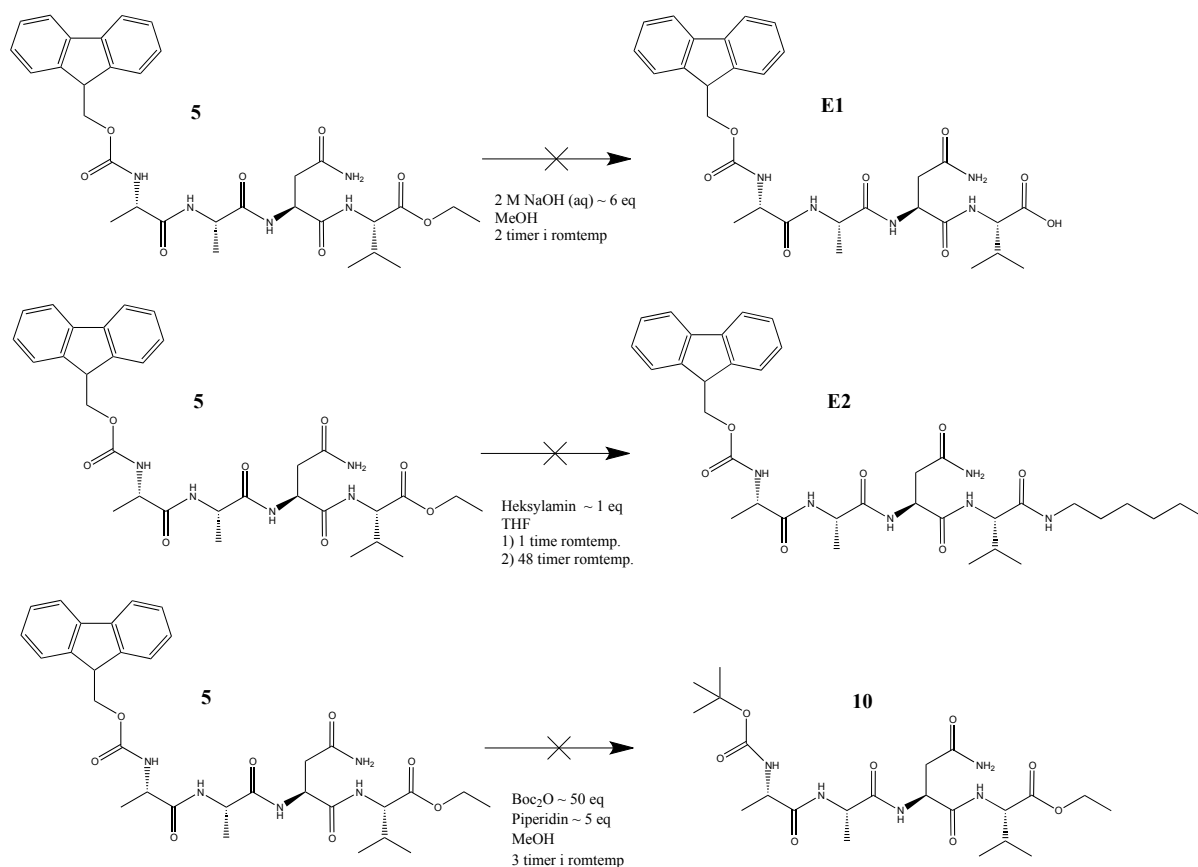


Skjema 4.C. Synteseskjema for syntese av sink-chelaterende-AEP-substrat, forbindelse **17**.

I syntesearbeidet ble det valgt å benytte etylester for C-terminal beskyttelse av valin og alanin (valin-etyler og alanin-etyler). For esterhydrolyse ble hovedsakelig standardbetingelsene 2 M NaOH i MeOH benyttet. Det ble også benyttet 2 M NaOH i vann for prøve å oppnå direkte utfelling av forbindelsen ved pH regulering mot slutten av esterhydrolysen, men uten å lykkes. MeOH som gav bedre løselighet ble derfor valgt som løsemiddel i det videre syntesearbeidet fremfor vann.

For N-terminal beskyttelse ble i første omgang Fmoc-beskyttelsesgruppe benyttet. Men utover i syntesearbeidet, ved forbindelse **5**, viste det seg at Fmoc-beskyttelsesgruppen ikke var stabil nok ved standard esterhydrolysebetingelser under fjerning av etylester-beskyttelsesgruppen C-terminalt. ¹H NMR viste at Fmoc-gruppen i dette tilfellet ble spaltet samtidig med etylesteren. For å se på reaksjonsreaktiviteten videre uten å hydrolysere C-terminal etylester ble det forsøkt å reagere forbindelse **5** direkte med heksylamin uten hell. Direkte utbytting mellom Fmoc til Boc ble også utført uten gode resultater (se **skjema 4.D**).

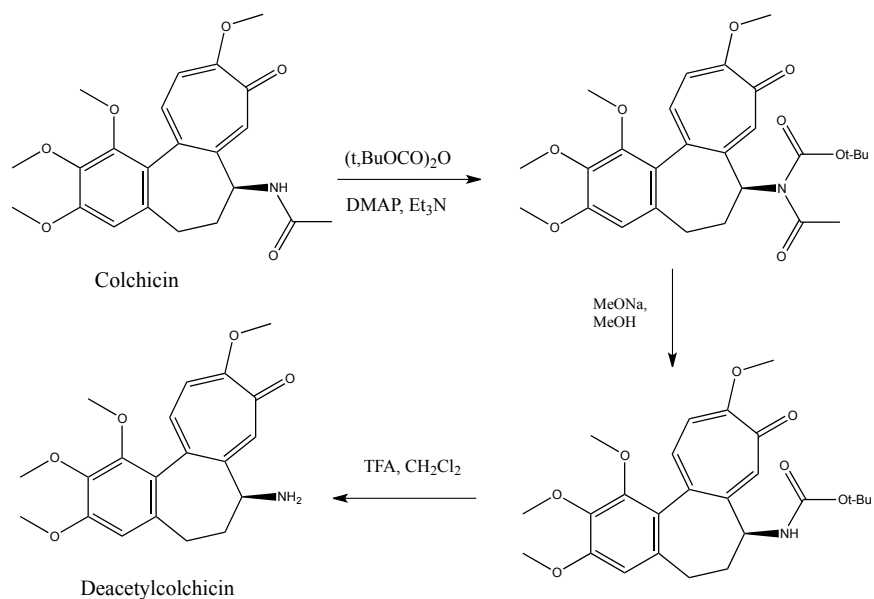
På bakgrunn av dette ble forbindelse **10** med Boc-beskyttelsesgruppe istedenfor Fmoc syntetisert. Det videre syntesearbeidet ble vellykket utført med forbindelsen **10**.



Skjema 4.D. Mislykkede videre synteseforsøk med forbindelse **5**.

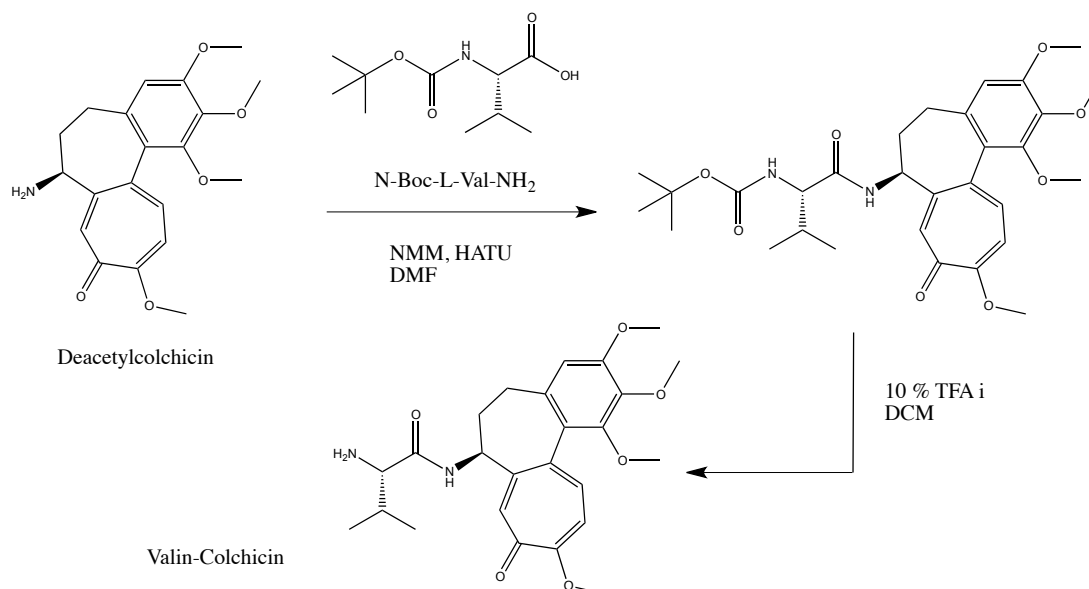
Sidekjedebeskyttelsesgruppe for asparagin ble ikke foretatt under syntesearbeidet da litteraturen tilsier at asparagin ofte benyttes uten. Uten sidekjedebeskyttelse er det en fare uønskede sidereaksjoner og dehydrering av peptidet, men denne risikoen minskes blant annet ved carbodiimidmediert peptidkobling med tilstedelse værelse av HOBt som er benyttet i syntesearbeidet (Isidro-Llobet 2009).

For å koble colchicin til AEP-substratforbindelse **11** må colchicin først deacetyleres (se **skjema 4.E**). Deacetyleringen ble vellykket utført og isolert av doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand ved avdeling for farmasøytisk kjemi ved Universitetet i Oslo. Metoden for deacetylering ble hentet artikkelen til gruppen til Lebeau (1997).



Skjema 4.E. Deactylering av colchicin til deacetylcolchicin (Lebeau et al. 1997).

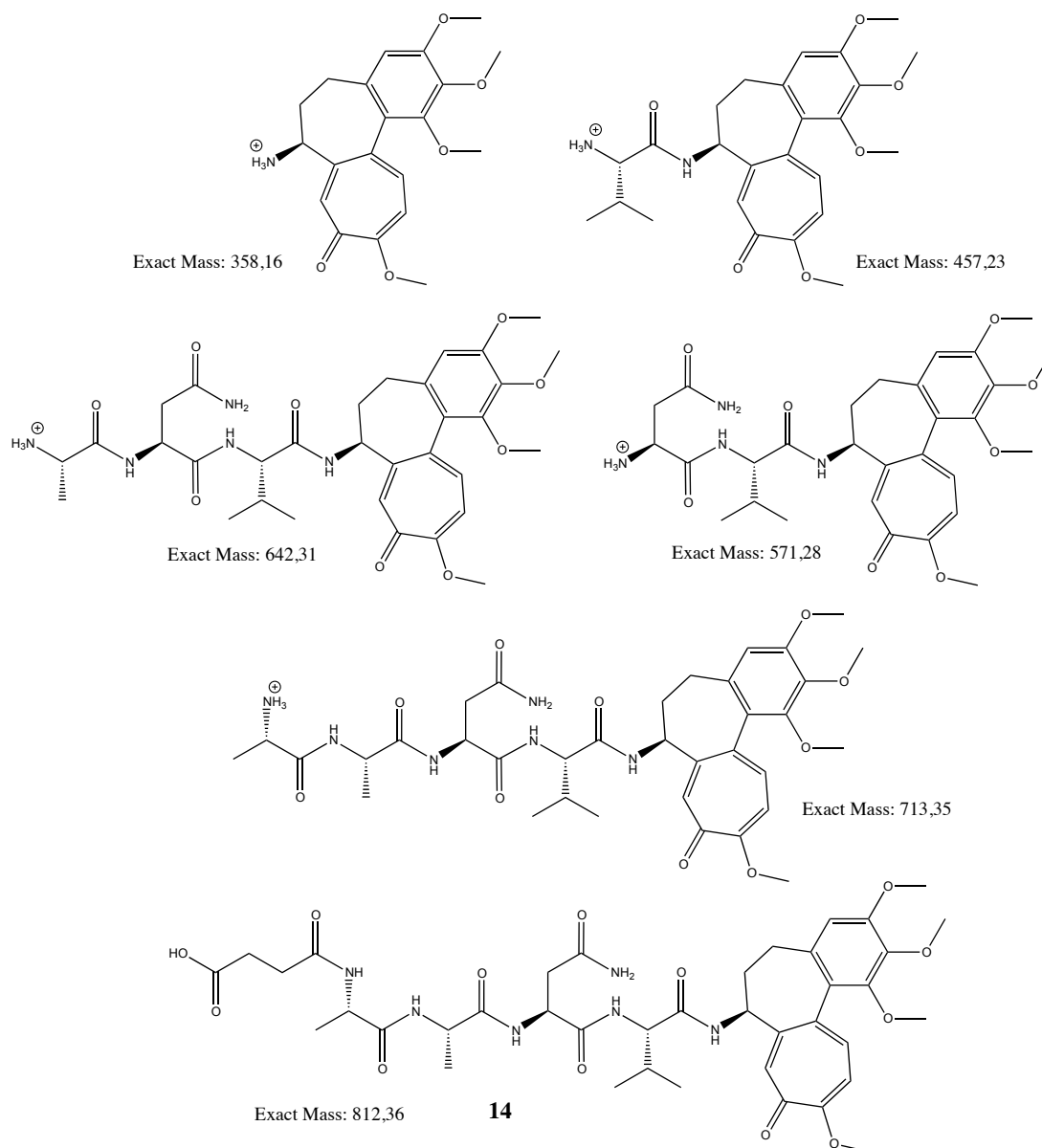
Et valin-colchicinderivat ble også syntetisert av doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand for å bli benyttet som kontroll ved biologisk evaluering. Deacetylcolchicin ble syntetisert tilsvarende (se **skjema 4.E**) og standard peptidkoblingsreagenser ble benyttet til å koble til deacetylcolchicin med valin (se **skjema 4.F**).



Skjema 4.F. Synteseskjema for syntese av valin-colchicin.

Opprensingsarbeidet mot sluttprodukt **14** ble mest krevende i syntesen. Som tilsiktet i konseptet ble forbindelse **14** svært godt vannløselig. På grunn av høy vannløselighet ble ekstrahering for å vaske bort bibrodukter ikke mulig. Videre opprensning med kolonne kromatografi, først med silika, og senere med aluminiumoksid, ble heller ikke vellykket. Det ble også forsøkt å finne et elueringssystem med hjelp av LC-MS, for så å overføre metoden over til en omvendtfase kolonne (C-18) kromatografi uten gode resultater. Samlet råprodukt ekstrakt av forbindelse **14** ble til slutt renset ved preparativ HPLC.

I tillegg til standard ^1H NMR og LC-MS ble det tatt CID-MS av forbindelse **14** for å se nærmere på produktene ved de to ulike retensjonstidene ($\text{RT}=7,6$ og $8,2$ min.) som viste lik m/z i massespektrogrammet.

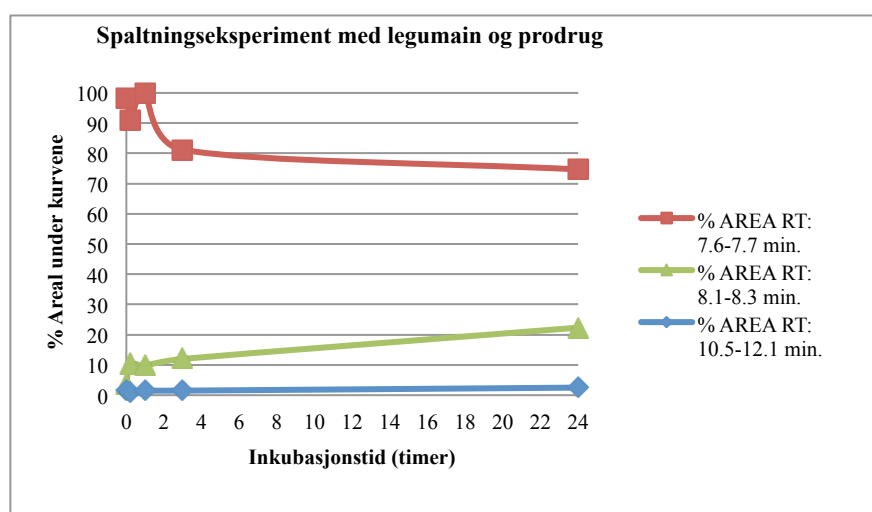


Figur 4.A. Forventede produksjoner av forbindelse **14** ved CID-MS.

Forventede produksjoner; 358,2 m/z, 457,2 m/z, 571,3 m/z, 642,3 m/z, 713,4 m/z og 813,4 m/z ble observert i CID-massespektrogram for begge forbindelser (se **figur 4.A** og vedlagt massespektrogram). Dette tyder på at molekylene er identiske. Forskjellen i retensjonstid skyldes antagelig at det har blitt dannet diasteromerer og/eller at forbindelsen eksisterer i to forskjellige konformasjoner. Forbindelsene ble separert ved preparativ HPLC og merket **14** (større andel) og **14*** (mindre andel).

I første omgang ble forbindelse **14** ble oversendt til *in vitro* biologisk evaluering ved seksjon for Farmakologi, Avdeling for Farmasøytisk biovitenskap, ved Farmasøytisk Institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet ved Universitet i Oslo.

Det ble utført et *in vitro* eksperiment der forbindelse **14** ble løst i actatbuffer med pH 5 og inkubert med legumain. Fra litteraturen er det kjent at enzymet er aktivt ved sure forhold og inaktiveres ved nøytral pH. 1 M NaOH (aq) ble brukt for å nøytralisere bufferen og inaktivere enzymet etter ulike inkubasjonstider. HPLC ble benyttet for å monitorere spaltningen i løpet av 24 timer (se **figur 4.B**).

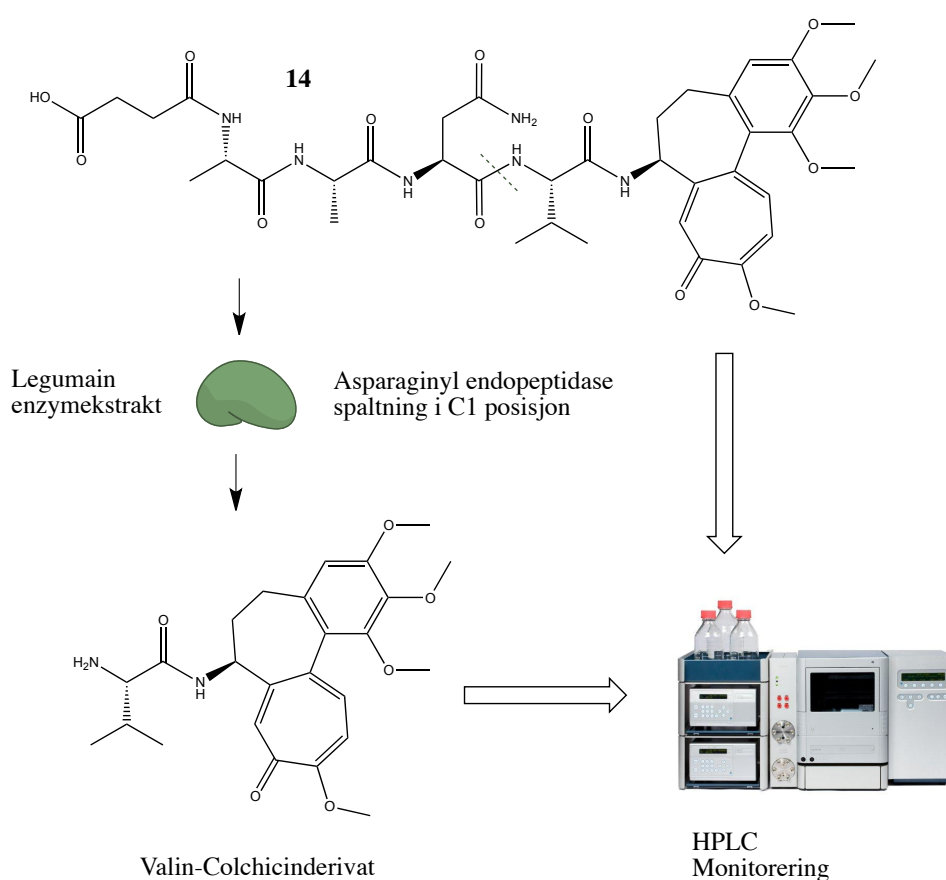


Figur 4.B. *In vitro* spaltningseksperiment med legumain og prodrug.

Det hadde vært ideelt i monitorere eksperimentet ved LC-MS for å få eksakt identifikasjon av spaltningsproduktene ved m/z, men da MS-detektoren i instrumentet var ute av drift ble HPLC benyttet. For å kompensere ble det tatt HPLC analyse av valin-colchicin blandet med prodrug og enzymet for å ta hensyn til eventuelle koelueringseffekter. Dermed kan det bli

foretatt en direkte sammenligning mellom analysene. Kontrollprøver for å se om produket var stabilt i analyseforholdene ble også laget.

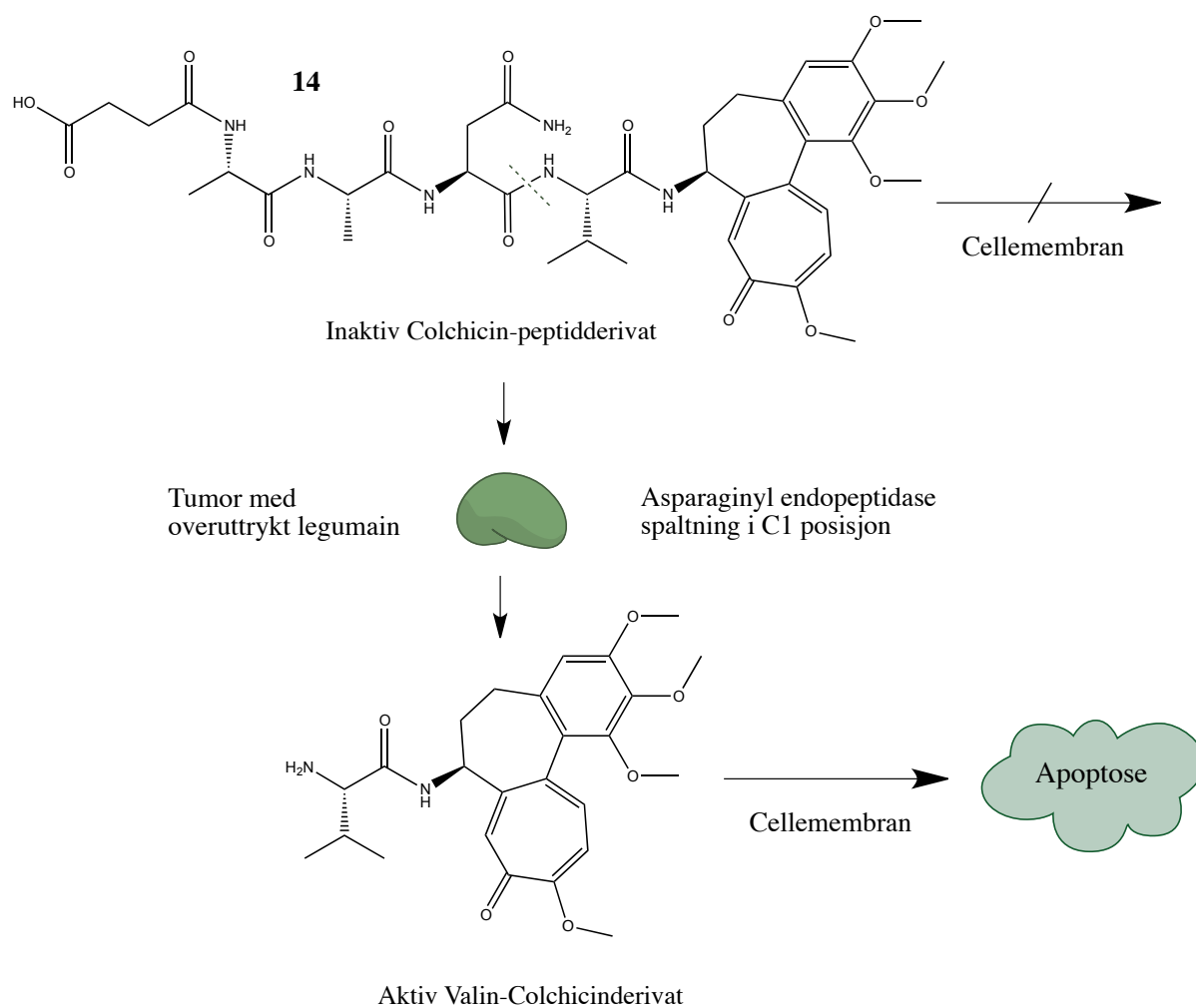
Forbindelse **14** viste seg å være stabil i actatbuffer alene og actatbuffer tilsatt base. HPLC viste videre at noe av forbindelse **14** ble spaltet av legumain til to spaltningsprodukter (se **figur 4.B**). En direkte sammenligning mellom spaltningsprodukter i enzymanalysene og analyse av valin-colchicin i koelueringssystemet viste at forbindelse **14** ble spaltet til en colchicin-valin forbindelse (se vedlagte HPLC kromatogrammer). Det andre spaltningsproduktet kan være Ala-Ala-Asn-peptidvektoren (se **figur 4.C**).



Figur 4.C. Spaltning av forbindelse **14** til valin-colchicinderivat ved legumain-ekstrakt.

Konsentrasjonsberegninger ble ikke gjort da det ikke ble benyttet internstandard i eksperimentet. Men ut ifra grafen ser vi at produket (RT: 7.6-7.7 min.) ble spaltet og redusert i samsvar med at valin-colchicin (RT:8.1-8.3) ble økt i løpet av eksperimentet (se **figur 4.B**). Selv om spaltningen ikke ble fullstendig er det rimelig å anta at prodrug ble spaltet av enzymet. I dette eksperimentet har ikke forholdet mellom konsentrasjon av legumain mot

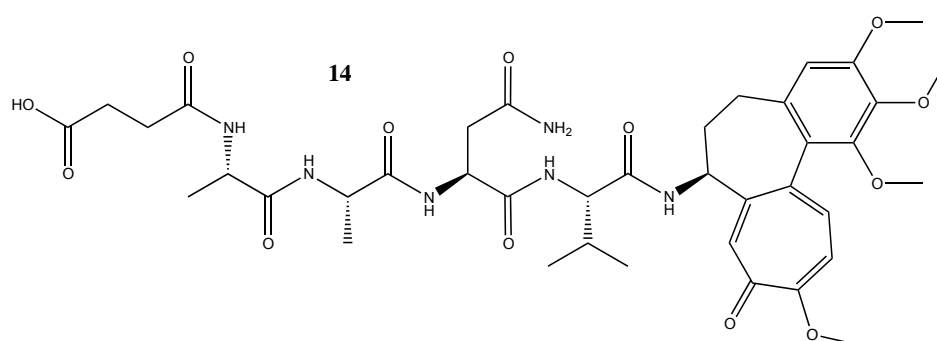
konsentrasjon av prodrug blitt optimalisert. Dermed er det vanskelig å fastslå hvor godt egnet prodruset er som substrat tiltros for at det bare ser ut som at en begrenset del av prodruset spaltes. Det er mange faktorer som kan spille inn her. For eksempel kan en mulig produkt-inhibisjon av enzymet redusere spaltningen. Uansett ser resultat veldig spennende ut. Eksperimentet viser en klar antydning til at prodrug spaltes ved legumain til valin-colchicin. Og dermed kan muligens tilsiktet selektivt virkning i tumorceller og redusert toksisk påvirkning i friske celler bli oppnådd (se **figur 4.D** for legumainprotease-aktivering av prodrug til valin-colchicin).



Figur 4.D. Legumainprotease-aktivering av prodrug til valin-colchicin.

5 Konklusjon

Forbindelse **14**, colchicin-AEP-substrat-prodrug (se **figur 5.A**) ble syntetisert og evaluert *in vitro* med et rent legumain enzymekstrakt. Det grove spaltningseksperiment viste at legumain spaltet prodrugget ved asparaginyll og valin-colchicin ble frigjort. Prodrug spalting ved legumain til valin-colchicin har dermed mulighet til å utøve sin virkning mer selektivt i tumorceller og toksisk påvirkning i friske celler vil kunne reduseres (se **figur 4.D**).



Figur 5.A. Prodrug-forbindelse **14**.

I spaltningseksperimentet ble det vist at syntetisert peptidvektor har affinitet for legumain og at prodrugget blir spaltet etter foreslåtte prinsipper. Beviset av konseptet bekrefter at syntesearbeidet frem til peptidvektoren er verdifullt og at arbeidet kan benyttes som basis for å syntetisere andre peptidsubstraterderivater med affinitet for legumain. Videre har også det spennende resultatet i denne masteroppgaven lagt et viktig grunnlag for videre biologisk evaluering av prodrugget i HEK- og legumain-transfektete-HEK-celler med mer.

6 Videre arbeid

I det videre arbeidet vil det være aktuelt å måle optisk rotasjon, eventuelt generere krystallstruktur av forbindelse **14** og **14***. I første omgang ble det kun foretatt biologisk evaluering av forbindelse **14**. Om det viser seg at forbindelse **14** og **14*** er diastomerer vil det være høyst aktuelt å måle aktivitet av begge forbindelsene. I beste tilfelle er forbindelsene ulike i et ubetydelig kiralt senter, som ikke påvirker spatningen og den biologiske aktiviteten. Det er imidlertid sannsynlig at legumain bare binder seg til isomeren hvor alle de stereogene sentrene er som beskrevet i litteraturen.

Det vil være nyttig å foreta full karakterisering av forbindelse **14**. I tillegg til optisk rotasjon og krystalldyrking, vil det blant annet være aktuelt å foreta mer avansert ^{13}C NMR-spektroskopi, IR-spektroskopi, høy oppløsning MS, smeltepunkt, med mer.

Videre skal det bli meget interessant å utføre nevnte planlagte biologiske assay med forbindelse **14** i HEK- og legumain-transfektete-HEK-celler. Om resultatene viser seg å være positive vil det være interessant å syntetisere, isolere, karakterisere og biologisk evaluere forbindelse **17**. Eventuelt vil det bli aktuelt å forsøke kobling med andre lipofile sinkchelatorer syntetisert av doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand.

Alternativt kan det bli nyttig å forsøke å utvikle en SPPS metode for å syntetisere peptidvektoren. Dette vil gjøre oppskaleringsarbeidet og muligens opprensningsprosedyren av sluttproduktet lettere.

Hvis forsøk i HEK- og legumain-transfektete-HEK-celler ser lovende ut for prodrugene, kan det bli aktuelt å teste forbindelsene på andre cellemodeller. Om resultatene av disse forsøkene også er positive vil det bli kanskje bli aktuelt å ta neste skritt og å prøve ut prodrugene i ulike dyremodeller på Radiumhospitalet, som professor Harald Thidemann Johansen og professor Rigmor Solberg har et nært samarbeid med.

7 Eksperimentelt

7.1 Materiale og apparatur

7.1.1 Kjemikalier

Alle reagenser, reaktanter og løsemidler ble kjøpt fra Sigma-Aldrich og brukt uten videre rensing, med mindre annet er beskrevet. Colchicin (95 %) ble kjøpt fra TCI Europe.

7.1.2 Tynnsjiktchromatografi (TLC)

TLC ble utført med TLC-aluminiumsplater med silikagel 60 F₂₅₄, aluminiumoksid 60 F₂₅₄ eller RP-18 F₂₅₄ ifra Merck. Sonene ble gjort synlige med UV-lys (256nm) eller ved fremkalling i kaliumpermanganat-løsning.

7.1.3 Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR)

Det ble tatt ¹H NMR av alle mellomprodukter og sluttprodukter, med mindre annet er beskrevet. ¹H NMR ble tatt opp på et DPX300 instrument med en automatisk prøveholder, med mindre annet er beskrevet. Prøvene ble løst i CDCl₃ eller DMSO-d₆ og analysert ved romtemperatur. Spektrene ble bearbeidet i Mestrenova versjon 7. Koblingskonstantene (J) blir rapportert i hertz (Hz), og kjemiskshiftverdi (δ) blir rapportert i parts per million (ppm) i forhold til løsemiddelet. Det ble også forsøkt tatt ¹³C NMR av alle sluttprodukter, men data ble ikke rapportert da de ikke tilstrekkelig gode.

7.1.4 Væskeskromatografi og massespektroskopi (LC-MS)

Det ble tatt LC-MS av alle mellomprodukter og sluttprodukter med molekylvekt over 450 g/mol og av alle produkter som ikke var rene nok for ¹H NMR tolkning. LC ble tatt på et Agilent Technologies 1200 Series instrument og MS ble tatt på et tilhørende Agilent Technologies 6310 Ion Trap LC/MS instrument. Data ble behandlet med tilhørende DataAnalysis programvare og Agilent MSD Trap versjon 4. Retensjonstid (RT) blir rapportert i minutter og molekylion (m/z) blir rapportert i masse per ladning.

Følgende HPLC-parametere ble benyttet; kolonne: C-18 med C-18 forkolonne, flow: 0,800 ml/minutt, temperatur: 25 C og UV-deteksjon: 254 nm. En universal gradient ble benyttet som mobilfase for å gjøre retensjonstidene til de ulike produktene gjennom syntesearbeidet enklere og sammenligne (se **tabell 7.1.4**). Følgende ESI-kilde betingelser ble benyttet i MS; forstøvertrykk: 60 psi, tørrgassflow: 11,0 l/minutt og tørrgassstemperatur 365 C.

Tabell 7.1.4. LC-MS gradient.

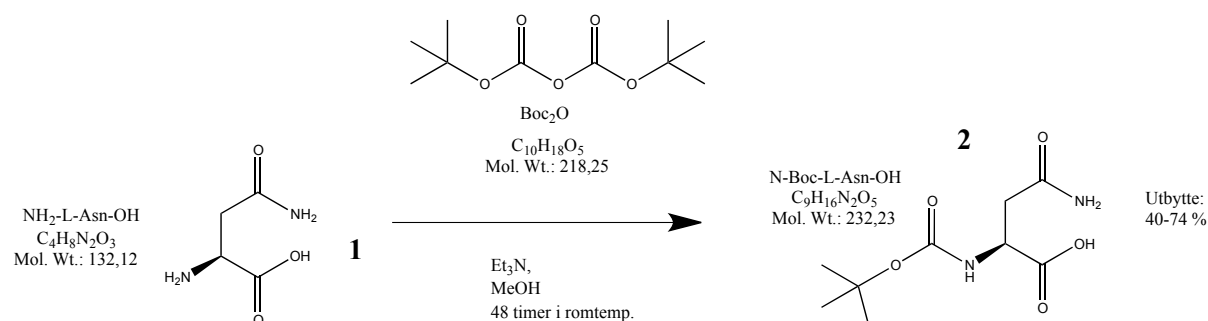
Tid	% H ₂ O:MeCN (95:5)	% MeCN	% MeCN	% H ₂ O:MeCN (95:5) + 10 nM HCOOH
0.00	100	0	0	0
3	65	10	25	0
5	25	25	50	0
10	30	40	25	5
12	0	70	25	5
13	100	0	0	0

7.1.5 Preparativ HPLC

Preparativ HPLC ble benyttet for å rense sluttprodukt **14**. Preparativ HPLC instrument ble lånt ifra en utenforliggende institusjon. Overnevnte institusjon med instrument ønsker ikke å bli nevnt i denne oppgaven. For separasjonen ble det benyttet en Vann, 0,1 % TFA og MeCN, 0,1 % TFA gradienteluering.

7.2 Syntese av forbindelse 2 (1-2)

Forbindelse 2, Boc-beskyttet-L-asparagin, med molekylstruktur C₉H₁₆N₂O₅ og molekylvekt 232,23 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.2**):



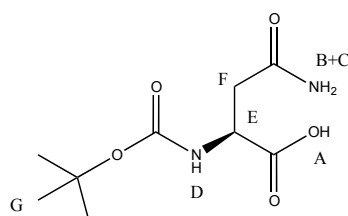
Skjema 7.2. Synteseskjema for syntese av forbindelse 2.

L-Asn-OH (1 eq) ble løst i MeOH (~0,8 mmol aminosyre per ml) til en overmettet reaksjonsløsning og satt til omrøring i isbad. Et₃N (2,2 eq) ble tilsatt reaksjonsløsningen med plastsprøyte og kanyle. Boc₂O (1,2 eq) ble tilsatt med pipette og reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i romtemperatur i 48 timer. Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med vann (~0,32 mmol aminosyre per ml) og EtOAc (~0,32 mmol aminosyre per ml) og adskilt. Organisk fase ble samlet, vannfasen ble pH regulert (pH ~1-2) med 1 M HCl og ekstrahert med EtOAc (5 x 50 ml per 100 ml vannfase). Samlet organisk fase ble tørket over MgSO₄ (s), tørkemiddel filtrert bort, og løsningen dampet til et hvitt krystallinsk pulver. Eventuelle forurensinger ble fjernet ved omkrystallisering i MeOH (~0,3 g/ml).

Syntese prosedyren ble utført 6 ganger på 2-10 grams skala. Prosentvis utbytte varierte fra 40-74 %. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 12,51 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,99-6,78 (m, 2H), 4,31-4,13 (m, 1H), 2,48-2,34 (m, 2H) og 1,37 (s, 9H) (se **tabell 7.2** og vedlagt H¹ NMR spekter). De spektrometriske dataene er i overenstemmelse med publiserte verdier (Hanhong 2012).

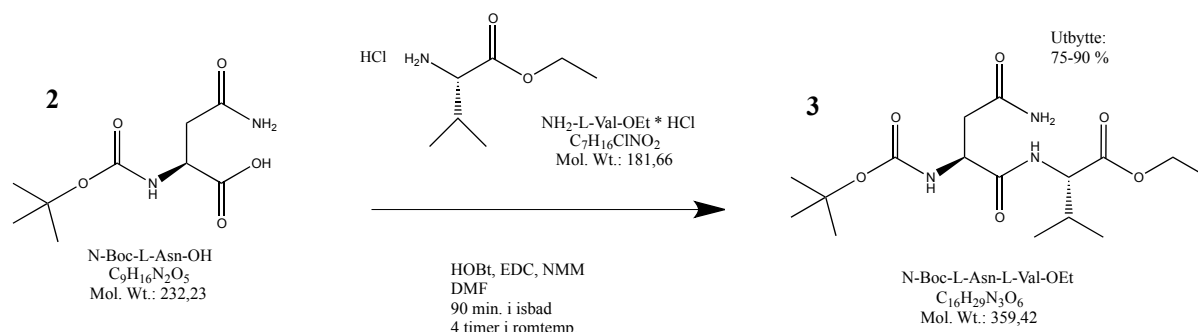
Tabell 7.2. ¹H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse 2.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
N-Boc-L-Ans-OH				
12,50	s	1	1H i -OH i karboksylsyre	A
7,30	s	1	1H i -NH ₂ i fri amid	B
6,90	s	1	1H i -NH ₂ i fri amid	C
6,87-6,84	d	1	1H i -NH- i amid ved -CH-	D
4,21	m	1	1H (stereo) i -CH- ved amid og -CH ₂ -	E
2,48	m	2	2H ved -CH- (stereo)	F
1,35	s	9	9H i 3 x CH ₃ i Boc	G



7.3 Syntese av forbindelse 3 (2-3)

Forbindelse **3**, Boc-beskyttet-L-asparagin koblet med etylester-beskyttet-L-valin, med molekylstruktur $C_{16}H_{29}N_3O_6$ og molekylvekt 359,42 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.3**):

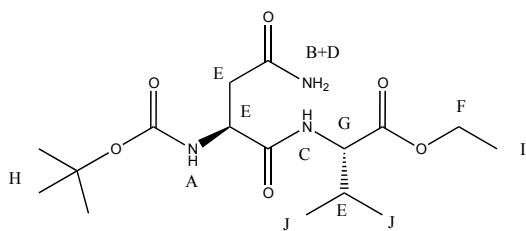


Skjema 7.3. Synteseskjema for forbindelse **3**.

L-Val-OEt * HCl (1 eq) ble løst i DMF (0,5 mmol peptid per ml) under nitrogen atmosfære og satt til omrøring i isbad. NMM (2 eq) ble tilsatt med sprøyte og reaksjonsløsningen ble satt til omrøring i 15 minutter. N-Boc-L-Asn-OH (1,2 eq), EDC (1,2 eq) og HOBT (1 eq) ble tilsatt med litt DMF og reaksjonsløsningen ble satt til omrøring i 90 minutter i isbad og 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med vann (100 ml) og CH_2Cl_2 (50 ml), og ekstrahert med CH_2Cl_2 (5 x 50 ml). Samlet organisk fase ble vasket med 1 M HCl (2 x 50 ml), mettet NaCl-løsning (50 ml) og 1 M $NaHCO_3$ (2 x 50 ml), og tørket over $MgSO_4$ (s). Tørkemiddel ble filtrert bort og løsning ble dampet til ett hvitt pulver på rotavapor og vakuumpumpe.

Tabell 7.3. 1H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse **3**.

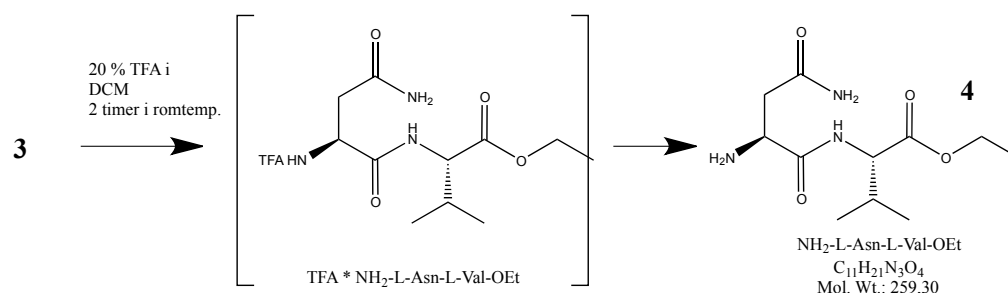
δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
N-Boc-L-Asn-L-Val-OEt				
7,83	d	1	1H i -NH- i amid ved -CH- i Asn	A
7,27	s	1	1H i -NH ₂ i fri amid i Asn	B
7,00	d	1	1H i -NH- i amid ved -CH- nær Val	C
6,90	s	1	1H i -NH ₂ i fri amid i Asn	D
4,37-3,99	m	4	4H i resterende -CH ₂ - og 2 x -CH-	E
2,47-2,21	m (q)	2	2H i -CH ₂ - ved -CH ₃ - i Val	F
2,04	dd	1	1H i -CH- ved -CH- og -NH- i amid i Val	G
1,37	s	9	9H i 3 x -CH ₃ - i Boc-enhet	H
1,18	t	3	3H i -CH ₃ - ved -CH ₂ - i Val	I
0,86	d	6	6H i 2 x -CH ₃ - ved -CH- i Val	J



Syntesen ble utført 6 ganger på 1-5 grams skala. Prosentvis utbyttet varierte mellom 75-90 %. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.37 – 3.99 (m, 5H), 2.47 – 2.21 (m, 3H), 2.04 (dd, $J = 13.1$, 6.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H) (se **tabell 7.3** og vedlagt ^1H NMR spekter).

7.4 Syntese av forbindelse 4 (3-4)

Forbindelse 4, L-asparagin koblet med etylester-beskyttet-L-valin, med molekylstruktur $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$ og molekylvekt 259,30 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.4**):



Skjema 7.4. Synteseskjema for forbindelse 4.

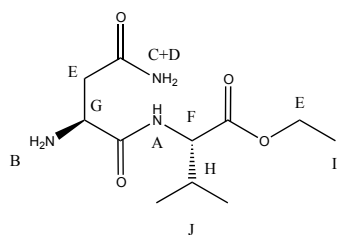
N-Boc-L-Asn-L-Val-OEt (1 eq) ble løst i DCM tilsvarende 20 % TFAA i DCM og satt til omrøring i isbad. TFAA (6 eq) ble tilsatt reaksjonsløsningen og satt omrøring i isbad i 15 minutter, etterfulgt av omrøring i romtemperatur i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble så dampet av på rotavapor og vakuumpumpe over natten.

Syntesen ble utført 7 ganger på 0,1-4 grams skala. Prosentvis utbyttet ble vanskelig å fastsette grunnet mye TFAA overskudd og ble valgt til å beregne over to trinn. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 8.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.10 (s, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 4.24-4.04 (m, 4H), 2.70 (dd, $J = 17.1$, 4.1 Hz, 1H), 2.57 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 2.09 (dq, $J = 13.4$,

6.8 Hz, 1H), 1.19 (dd, $J = 9.1, 5.1$ Hz, 3H), 0.91 (dd, $J = 6.8, 3.0$ Hz, 6H) (se **tabell 7.4** og vedlagt ^1H NMR spekter).

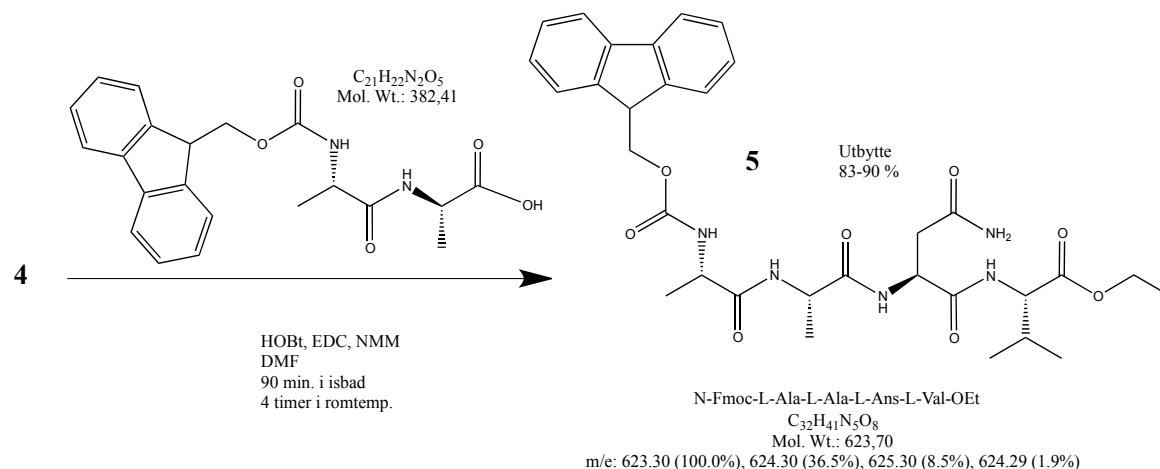
Tabell 7.4. ^1H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse 4.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
NH₂-L-Asn-L-Val-OEt				
8,66	d	1	1H i -NH- i amid ved -CH- ved Val	A
8,10	d	2	2 H i -NH ₂ - i amin ved -CH- i Asn	B
7,74	s	1	1H i -NH ₂ i fri amid i Asn	C
7,31	s	1	1H i -NH ₂ i fri amid i Asn	D
4,24-4,04	m	4	4H i resterende 2x -CH ₂ - i Asn og Val	E
2,70	dd	1	1H i -CH- ved -CH- og -NH- i amid i Val	F
2,57	m	1	1H i -CH- (stereo.) ved -CH ₂ - og -NH ₂ i amin i Asn	G
2,09	dq	1	1H i -CH- ved -CH- og 2 x -CH ₃ - (sym.) i Val	H
1,19	t	3	3H i -CH ₃ - ved -CH ₂ - i Val	I
0,91	dd (d)	6	6H i 2 x -CH ₃ - ved -CH- i Val	J



7.5 Syntese av forbindelse 5 (4-5)

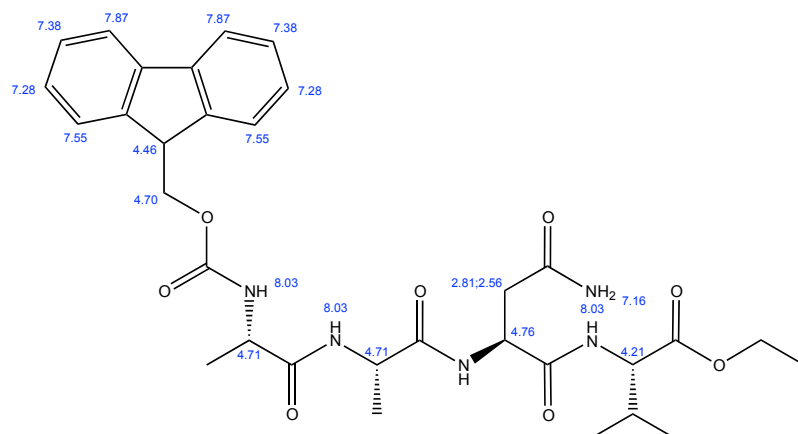
Forbindelse 5, Fmoc-beskyttet-L-alanin-L-alanin koblet med L-asparagin koblet med etylester-beskyttet-L-valin, med molekylstruktur $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_8$ og molekylvekt 623,70 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.5**):



Skjema 7.5. Synteseskjema for forbindelse 5.

NH₂-L-Asn-L-Val-OEt i TFAA overskudd ble bestemt ved base titrering. NH₂-L-Asn-L-Val-OEt i TFAA overskudd (1eq) ble løst DMF (0,5 mmol peptid per ml) og NMM (tilsvarende 1 eq mer enn antall eq overskudd TFAA) ble tilsatt reaksjonsblandingen med sprøyte og kanyle under nitrogen atmosfære og satt til omrøring i isbad. N-Fmoc-L-Ala-L-Ala-OH (1 eq), EDC (1,2 eq) og HOBt (1 eq) ble veid inn i et veieskip og tilsatt reaksjonsløsningen med litt DMF. Reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i isbad i 90 minutter og i romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med vann (100 ml) og EtOAc (50 ml), og ekstrahert med EtOAc (5 x 50 ml). Samlet organisk fase ble vasket med 1 M HCl (2 x 50 ml), mettet NaCl-løsning (50 ml) og 1 M NaHCO₃ (2 x 50 ml), og tørket over MgSO₄ (s). Tørkemiddel ble filtrert bort og løsning ble dampet til ett hvitt pulver på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 2 ganger på 0,5 og 1 grams skala. Prosentvis utbyttet ble henholdsvis 83 og 90 %. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 8.09 (dd, J = 25.7, 7.4 Hz, 2H), 7.93-7.66 (m, 6H), 7.54-7.27 (m, 6H), 6.98-6.91 (m, 1H), 4.57 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 4.32-3.96 (m, 8H), 2.43 (dd, J = 15.7, 7.1 Hz, 1H), 2.13-1.93 (m, 1H), 1.27-1.12 (m, 9H), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, 6H) (se vedlagt ¹H NMR spekter). Ut ifra standard ¹H NMR og COSY NMR er det vanskelig å anta tilordninger. Men data tyder på riktig antall protoner, aromatiske signaler fra Fmoc-enhet, signaler fra protoner i amidene og signaler ifra dimetylenhet i valin og tre tilnærmede like signaler til metyl gruppene i alaninene samt signaler fra etylesteren (se **figur 7.5** for ChemBioDraw ¹H NMR kjemisk skiftverditilordning prediksjon for forbindelse 5).



Figur 7.5. ChemBioDraw ¹H NMR kjemisk skiftverdi og tilordning prediksjon for forbindelse 5.

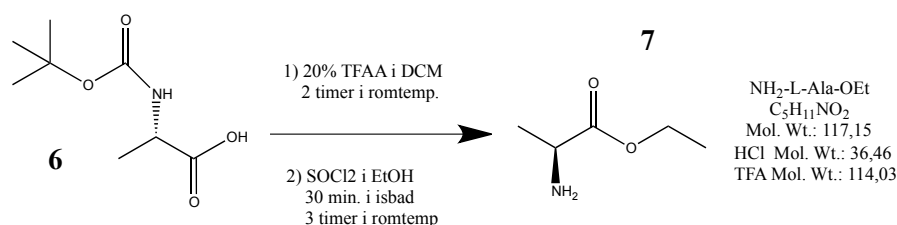
LC-MS viste ren UV kromatogram og produktdannelse (RT=8,3 min.) ved m/z 624.4 (M+1) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram).

7.6 Syntese av forbindelse 6

Forbindelse 6, Boc-beskyttet-L-alanin, med molekylstruktur $C_8H_{15}NO_4$ og molekylvekt 189,21 g/mol, ble ikke syntetisert da forbindelsen var tilgjengelig i mer enn tilstrekkelig mengde.

7.7 Syntese av forbindelse 7 (6-7)

Forbindelse 7, etylester-beskyttet-L-alanin, med molekylstruktur $C_5H_{11}NO_2$ og molekylvekt 117,15 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.7**):



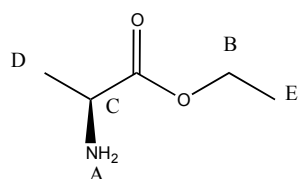
Skjema 7.7. Synteseskjema for forbindelse 7.

N-Boc-L-Ala-OH (1 eq) ble løst i DCM tilsvarende 20 % TFAA i DCM og satt til omrøring i isbad. TFAA (6 eq) ble tilsatt reaksjonsløsningen og satt omrøring i isbad i 15 minutter, etterfulgt av omrøring i romtemperatur i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble så dampet av på rotavapor og vakuumpumpe til en seig flytende klar væske. Mellomproduktet ble videre løst i et overskudd av EtOH (0,25 mmol/ml) og satt til omrøring i isbad. $SOCl_2$ (3,0 mmol/ml) ble tilsatt reaksjonsløsningen dråpevis med drypper. Reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i isbad i 30 minutter og ved romtemperatur i 3 timer. Deretter ble reaksjonsblandingen dampet av på rotavapor og vakuumpumpe.

Prosentvis utbyttet ble ikke beregnet. 1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 8.66-8.58 (m, 2H), 4.18 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.00 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H) (se **tabell 7.7** og vedlagt 1H NMR spekter).

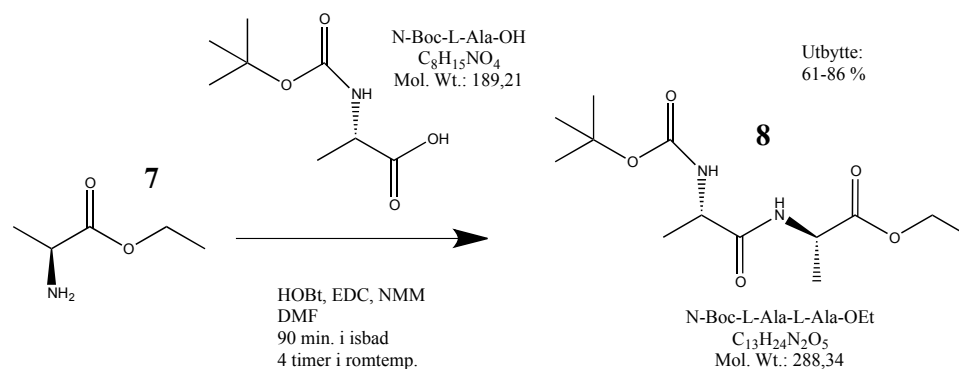
Tabell 7.7. ^1H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse 7.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
$\text{NH}_2\text{-L-Ala-OEt}$				
8.66-8.58	m	2	2H i $-\text{NH}_2$ ved stereo. -H	A
4.18	q	2	2H i $-\text{CH}_2\text{-}$ ved $-\text{CH}_3$ og $-\text{O-}$	B
4.00	q	1	H i $-\text{CH}$ ved $-\text{CH}_3$	C
1.41	d	3	3H i $-\text{CH}_3$ ved $-\text{CH}$	D
1.21	t	3	3H i $-\text{CH}_3$ ved $-\text{CH}_2\text{-}$	E



7.8 Syntese av forbindelse 8 (7-8)

Forbindelse 8, Boc-beskyttet-L-alanin koblet med etylester-beskyttet L-alanin, med molekylstruktur $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ og molekylvekt 288,34 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.8**):



Skjema 7.8. Synteseskjema for forbindelse 8.

$\text{NH}_2\text{-L-Ala-OEt}$ (1 eq) ble løst i DMF (0,5 mmol peptid per ml) under nitrogen atmosfære og satt til omrøring i isbad. NMM (2 eq) ble tilsatt med sprøyte og reaksjonsløsningen ble satt til omrøring i 15 minutter. N-Boc-L-Ala-OH (1 eq), EDC (1,2 eq) og HOBt (1 eq) ble tilsatt med litt DMF og reaksjonsløsningen ble satt til omrøring i 90 minutter i isbad og 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med vann (200 ml) og CH_2Cl_2 (50 ml), og ekstrahert med CH_2Cl_2 (6 x 50 ml). Samlet organiskfase ble vasket med 1 M HCl (2 x 50

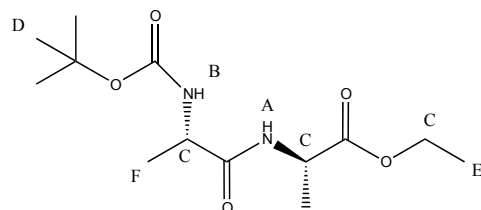
ml), mettet NaCl-løsning (50 ml) og 1 M NaHCO₃ (2 x 50 ml), og tørket over MgSO₄ (s). Tørkemiddelet ble filtrert bort og løsningen ble dampet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 6 ganger på 3-7 grams skala. Prosentvis utbyttet varierte mellom 61-86 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 8.15 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.35-3.91 (m, 4H), 1.37 (s, 9H), 1.31-1.24 (m, 3H), 1.17 (dq, *J* = 7.1, 3.7, 3.3 Hz, 6H) (se **tabell 7.8** og vedlagt ¹H NMR spekter).

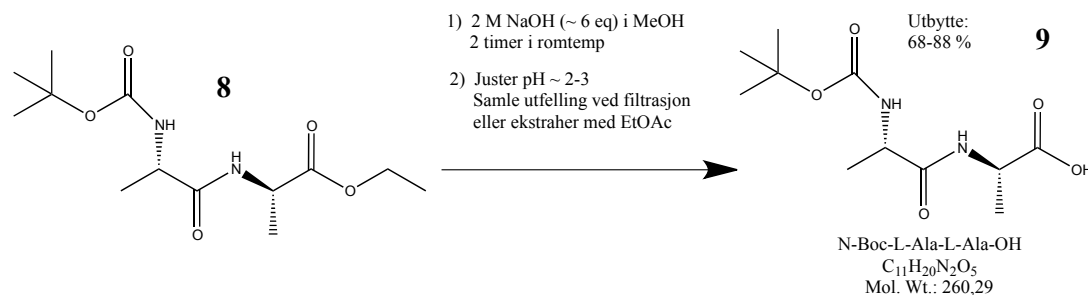
Tabell 7.8. ¹H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse 8.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
N-Boc-L-Ala-L-Ala-OEt				
8.15	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Ala-Ala kobling	A
6.84	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- i Ala ved Boc-gruppe	B
4.35-3.91	m	4	2H i 2 x -CH- ved -CH ₃ og 2H i -CH ₂ - ved CH ₃ i -OEt	C
1.37	s	9	9H i 3 x -CH ₃ - i Boc-enhet	D
1.31-1.24	m	3	3H i -CH ₃ ved -CH ₂ - i etylester	E
1.17	m	6	6H i 2 x -CH ₃ ved stereo. -CH- i 2 x Ala	F



7.9 Syntese av forbindelse 9 (8-9)

Forbindelse 9, Boc-beskyttet-L-alanin koblet med L-alanin, med molekylstruktur C₁₁H₂₀N₂O₅ og molekylvekt 260,29 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.9**):



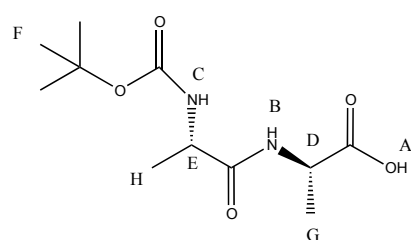
Skjema 7.9. Synteseskjema for forbindelse 9.

N-Boc-L-Ala-L-Ala-OEt (1 eq) ble løst i MeOH tilsvarende 2 M NaOH (6 eq) i MeOH og satt til omrøring. NaOH (6 eq) ble tilsatt og reaksjonsløsningen ble satt til omrøring ved rom temperatur i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble så pH justert til pH 2-3 med 1 M HCl og ekstrahert med EtOAc (6 x 50 ml). Samlet organiskfase ble tørket over MgSO₄(s), tørkemiddel ble filtrert bort og løsningen ble dampet til tørrhet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 7 ganger på 2-8 grams skala. Prosentvis utbyttet varierte mellom 68-88 %. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 12.31 (s, 1H), 7.99 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.20 (h, J = 7.6 Hz, 1H), 3.98 (p, J = 7.3 Hz, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.26 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.16 (d, J = 7.1 Hz, 3H) (se **tabell 7.9** og vedlagt ¹H NMR spekter).

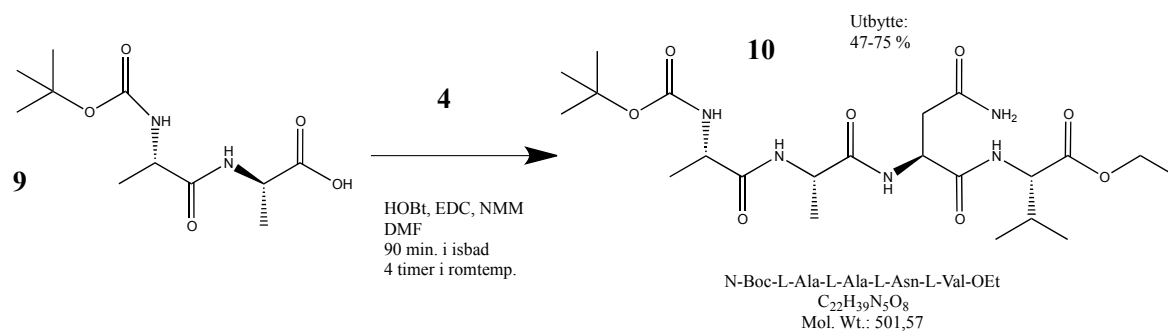
Tabell 7.9. ¹H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse 9.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
NH₂-L-Ala-Ala-OH				
12.31	s	1	1H i -OH i fri syre i Ala	A
7.99	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Ala-Ala kobling	B
6.86	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- i Ala ved Boc-gruppe	C
4.20	m	1	1H i -CH- ved -NH- og -CH ₃ i Ala med fri syre	D
3.98	m	1	1H i -CH- ved -NH- og -CH ₃ i Ala ved Boc-gruppe	E
1.37	s	9	9H i 3 x -CH ₃ - i Boc-enhet	F
1.26	d	3	3H i -CH ₃ ved -CH- i Ala med fri syre	G
1.16	d	3	3H i -CH ₃ ved -CH- i Ala ved Boc-gruppe	H



7.10 Syntese av forbindelse 10 (9-10)

Forbindelse 10, Boc-beskyttet-L-alanin-L-alanin koblet L-asparagin koblet med etylseter-beskyttet-L-valin, med molekylstruktur C₂₂H₃₉N₅O₈ og molekylvekt 501,57 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.10**):

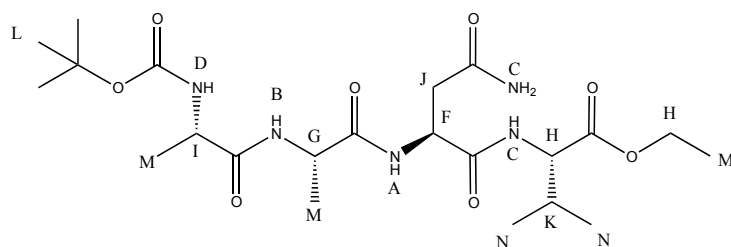


Skjema 7.10.. Synteseskjema for forbindelse 10.

NH₂-L-Asn-L-Val-OEt i TFAA overskudd ble bestemt ved base titrering. NH₂-L-Asn-L-Val-OEt i TFAA overskudd (1eq) ble løst DMF (0,5 mmol peptid per ml) og NMM (tilsvarende 1 eq mer enn eq overskudd TFAA) ble tilsatt reaksjonsblandingen med sprøyte og kanyle under nitrogen atmosfære og satt til omrøring i isbad. N-Boc-L-Ala-L-Ala-OH (1 eq), EDC (1,2 eq) og HOBt (1 eq) ble veid inn i et veieskip og tilsatt reaksjonsløsningen med litt DMF. Reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i isbad i 90 minutter og i romtemperatur i 4 timer.

Tabell 7.10. ¹H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse 10.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
N-Boc-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val-OEt				
8.16	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Ala-Asn kobling	A
7.91	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Ala-Ala kobling	B
7.81	d	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Asn-Val kobling	C
7.39-7.32	m	1	1H i -NH- amid ved -CH- i Ala ved Boc-enhet	D
6.92	d	2	2H i sekundær amin i Asn	E
4.57	m	1	1H i -CH- ved -NH- og -CH ₂ - i Asn	F
4.34-4.20	m	1	1H i -CH- ved -CH ₃ - og -NH- i Ala	G
4.20 -4.00	m	3	2H i -CH ₂ - i -OEt og 1H -CH- i Val	H
4.05-3.91	m	1	1H i -CH- ved -CH ₃ - og -NH- i Ala	I
2.41	m	2	2H i -CH ₂ - ved stereo. -CH- i Asn	J
2.04	td	1	1H i -CH- ved -CH- og 2 x -CH ₃ i Val	K
1.37	s	9	9H i 3 x -CH ₃ - i Boc-enhet	L
1.27-1.13	m	9	9H i 3 x -CH ₃ , 2 i 2 x Ala og 1 i -OEt	M
0.86	d	6	6H i 2 x -CH ₃ ved -CH- i Val	N

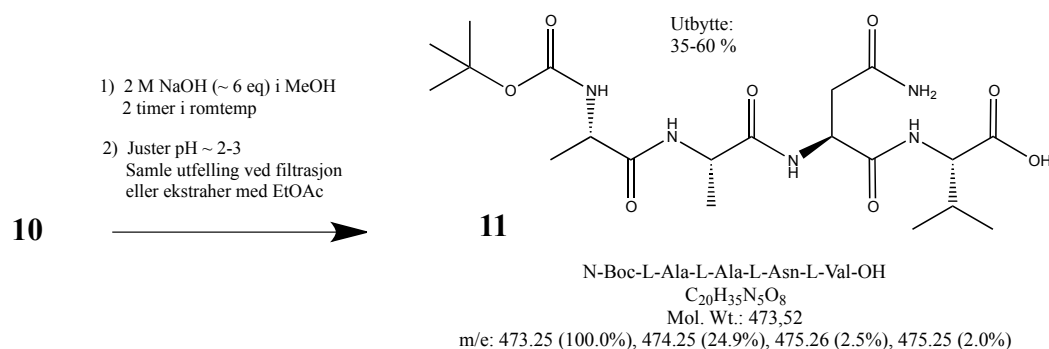


Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med vann (100 ml) og EtOAc (50 ml), og ekstrahert med EtOAc (5 x 50 ml). Samlet organisk fase ble vasket med 1 M HCl (2 x 50 ml), mettet NaCl-løsning (50 ml) og 1 M NaHCO₃ (2 x 50 ml), og tørket over MgSO₄ (s). Tørkemiddel ble filtrert bort og løsning ble dampet til ett hvitt pulver på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 5 ganger på 1-5 grams skala. Prosentvis utbyttet varierte mellom 47-75 %. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 8.16 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.39 – 7.32 (m, 1H), 6.92 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.34 – 4.20 (m, 1H), 4.20 – 4.00 (m, 3H), 4.05 – 3.91 (m, 1H), 2.41 (m, 2H), 2.04 (td, J = 12.9, 12.5, 6.3 Hz, 1H), 1.37 (s, 10H), 1.27 – 1.13 (m, 9H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 6H) (se **tabell 7.10** og vedlagt ¹H NMR spekter). LC-MS viste uren UV kromatogram med flere topper hvorav en av toppene (RT=8,3 min.) viste produktdannelse ved m/z = 502,2 (M+1) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram).

7.11 Syntese av forbindelse 11 (10-11)

Forbindelse 11, Boc-beskyttet-L-alanin-L-alanin koblet L-asparagin-L-valin, med molekylstruktur C₂₀H₃₅N₅O₈ og molekylvekt 473,52 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.11**):



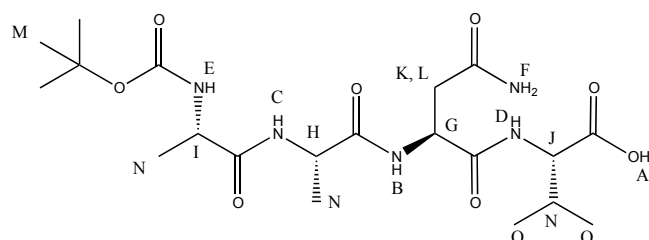
Skjema 7.11. Synteseskjema for forbindelse 11.

N-Boc-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val-OEt (1 eq) ble løst i MeOH tilsvarende 2 M NaOH (6 eq) i MeOH og satt til omrøring. NaOH (6 eq) ble tilsatt og reaksjonsløsningen ble satt til omrøring ved rom temperatur i 2 timer. Reaksjonsblanding ble så pH justert til pH 2-3 med 1 M HCl og ekstrahert med EtOAc (6 x 50 ml). Samlet organiskfase ble tørket over MgSO₄ (s), tørkemiddel ble filtrert bort og løsningen ble dampet til tørrhet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 9 ganger på 0,2-2 grams skala. Prosentvis utbyttet varierte mellom 35-60 %. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter ble tatt; δ 12.61 (s, 1H), 8.18 (dq, $J = 16.5, 8.5$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 7.2, 3.8$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 24.8, 8.5$ Hz, 1H), 7.41 – 7.25 (m, 1H), 6.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.68 – 4.51 (m, 1H), 4.26 (h, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 1H), 4.08 – 3.89 (m, 1H), 2.49 – 2.36 (m, 1H), 2.12 – 1.96 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.18 (td, $J = 7.1, 3.7$ Hz, 7H), 0.85 (td, $J = 6.6, 3.9$ Hz, 6H) (se **tabell 7.11** og vedlagt ^1H NMR spekter). LC-MS viste noe urent UV kromatogram, men produktdannelse (RT=6,7 min.) ved m/z 474,3 (M+1) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram).

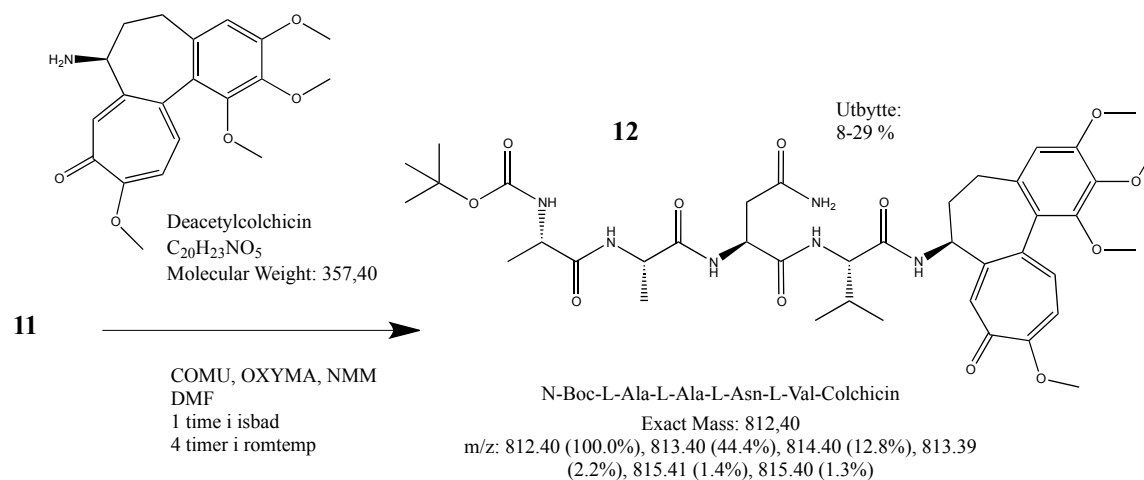
Tabell 7.11. ^1H NMR kjemisk skiftverdier, signaltyper og tilordninger for forbindelse **11**.

δ (ppm)	Type signal	Relativ antall protoner	Tilordning	Figur
Løsemiddeltopp				
2,50	p		DMSO	
N-Boc-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val-OH				
12.61	s	1	1H i -COOH i fri syregruppe i Val	A
8.18	d (dq)	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Ala-Asn kobling	B
7.91	d (dd)	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Ala-Ala kobling	C
7.67	d (dd)	1	1H i -NH- amid ved -CH- ved Asn-Val kobling	D
7.41-7.725	d (m)	1	1H i -NH- amid ved -CH- i Ala ved Boc-enhet	E
6.92	s (d)	2	2H i -NH ₂ i Asn	F
4.68-4.51	m	1	1H i -CH- ved -NH- og -CH ₂ - i Asn	G
4.26	m (h)	1	1H i -CH- ved -CH ₃ - og -NH- i Ala	H
4.20-4.04	m	1	1H i -CH- ved -CH ₃ - og -NH- i Ala	I
4.08-3.89	m	1	1H i -CH- ved -CH- og -NH- i Val	J
2.49-2.36	m	1	1H i -CH ₂ - ved stereo. -CH- i Asn	K
2.12-1.96	m	1	1H i -CH ₂ - ved stereo. -CH- i Asn	L
1.37	s	9	9H i 3 x -CH ₃ - i Boc-enhet	M
1.18	m (td)	7	7 H i 2 x -CH ₃ i 2 x Ala og -CH i Val	N
0,85	d (td)	6	6H i 2 x -CH ₃ ved -CH- i Val	O



7.12 Syntese av forbindelse 12 (11-12)

Forbindelse **12**, Boc-beskyttet-L-alanin-L-alanin-L-asparagin-L-valin koblet med deacetylcolchicin, med molekylstruktur $C_{40}H_{56}N_6O_{12}$ og molekylvekt 812,91 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.12**):



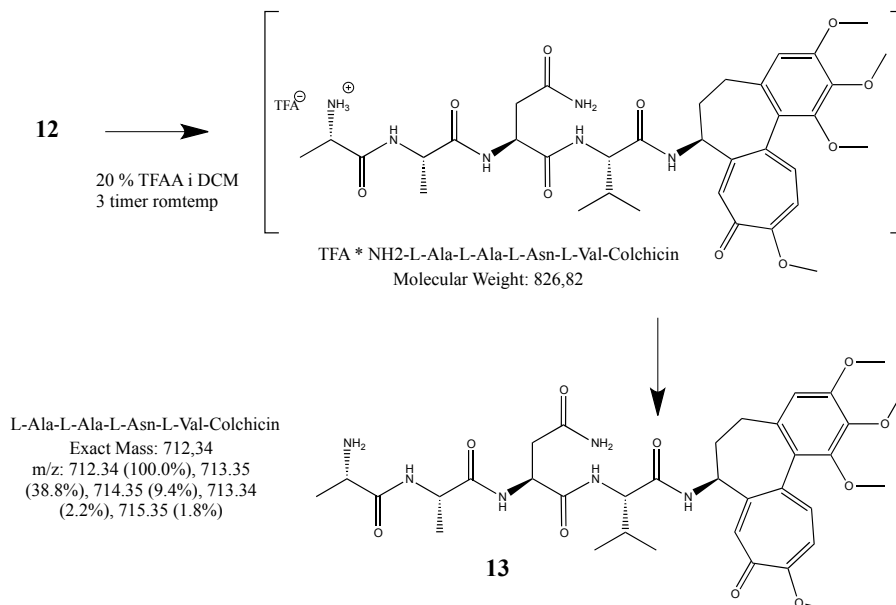
Skjema 7.12. Synteseskjema for forbindelse **12**.

N-Boc-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val-OH (1 eq) og deacetylcolchicin (1 eq) ble løst DMF (0,5 mmol peptid per ml) og satt under omrøring i isbad under nitrogen atmosfære. NMM (1 eq) ble tilsatt reaksjonsløsningen med sprøyte og kanyle. COMU (1,2 eq) og OXYMA (1 eq) ble veid inn i et veieskip og tilsatt reaksjonsløsningen med litt DMF. Reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i isbad i 90 minutter og i romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med EtOAc (100 ml) og vasket med 1 M HCl (2 x 20 ml), 1 M $NaHCO_3$ (2 x 20 ml) og mettet NaCl-løsning (2 x 20 ml). Samlet organisk fase ble tørket over $MgSO_4$ (s). Tørkemiddel ble filtrert bort og løsning ble dampet til tørrhet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 2 ganger på 0,05 og 0,4 grams skala. Prosentvis utbyttet ble henholdsvis 8 og 29 %. LC-MS viste uren UV kromatogram, men racematprodukt dannelse ($RT=8,5$ og $8,9$ min.) ved m/z 813,5 (M+1) og m/z 835,5 (M+23) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram). 1H NMR ble ikke tatt.

7.13 Syntese av forbindelse **13** (12-13)

Forbindelse **13**, L-alanin-L-alanin-L-asparagin-L-valin koblet med deacetylcolchicin, med molekylstruktur $C_{35}H_{48}N_6O_{10}$ og molekylvekt 712,79 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.13**):



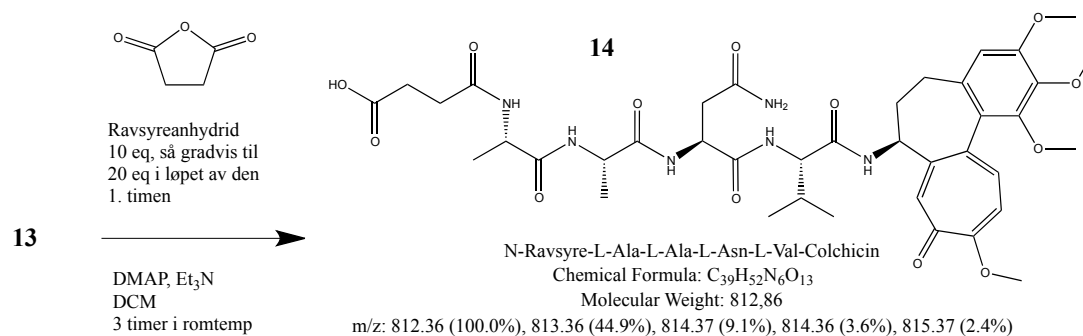
Skjema 7.13. Synteseskjema for forbindelse **13**.

N-Boc-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val-Colchicin (1 eq) ble løst i DCM tilsvarende 20 % TFAA i DCM og satt til omrøring i isbad. TFAA (6 eq) ble tilsatt reaksjonsløsningen med pippete og satt omrøring i isbad i 15 minutter, etterfulgt av omrøring i romtemperatur i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble så dampet til tørrhet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 4 ganger på 0,05-0,2 grams skala. Prosentvis utbytte ble > 100 % på grunn av TFAA rester. LC-MS viste uren UV kromatogram, men racematprodukt dannelse (RT=6,6 og 7,2 min.) ved m/z 713,4 (M+1) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram). ¹H NMR ble ikke tatt.

7.14 Syntese av forbindelse 14 (13-14)

Forbindelse **14**, L-alanin-L-alanin-L-asparagin-L-valin-deacetylcolchicin koblet med ravsyre, med molekylstruktur C₃₉H₅₂N₆O₁₃ og molekylvekt 812,86 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.14**):



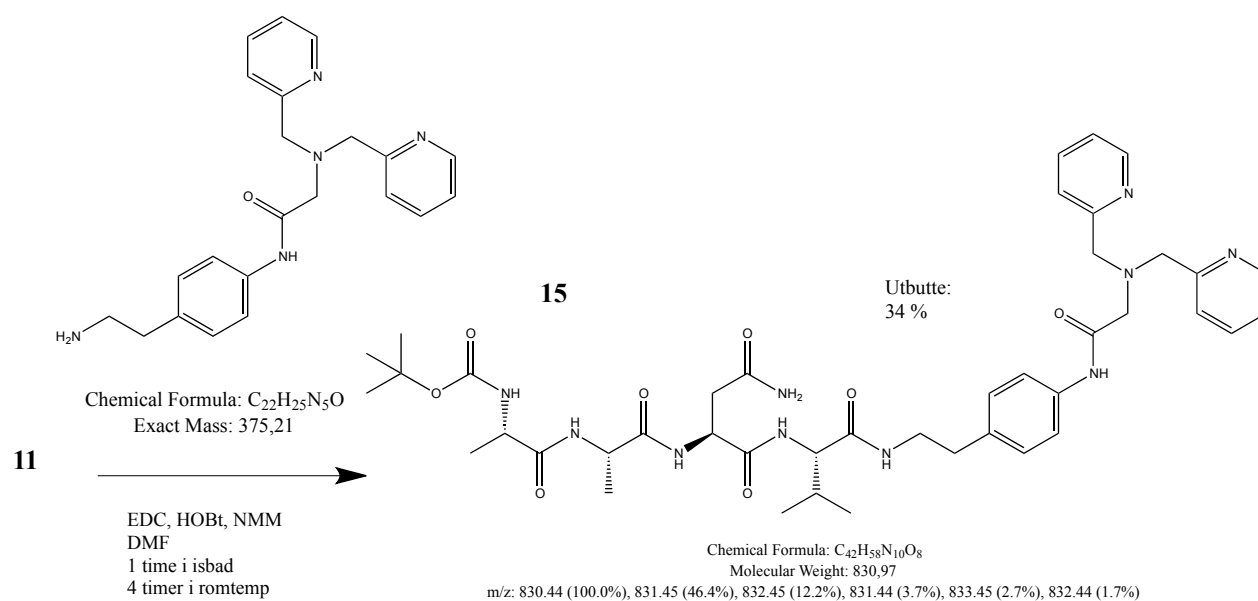
Skjema 7.14. Synteseskjema for forbindelse **14**.

NH₂-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val-Colchicin (1 eq) ble løst i DCM (0,5 mmol peptid per ml). Et₃N (1 eq), DMAP (0,1 eq) og ravsyreanhydrid (10 eq) ble tilsatt reaksjonsløsningen og satt til omrøring i romtemperatur. Ravsyreanhydrid (2,5 eq) ble tilsatt reaksjonsblandingen hvert 15. minutt i løpet av den første timen (totalt 10 eq). Reaksjonsblandingen ble satt til omrøringen i 3 timer og dampet til tørrhet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 3 ganger på 0,05-0,15 grams skala. Prosentvis utbytte varierte mellom 40 til > 100 % på grunn av urenheter. Forbindelse **14** ble for hydrofil for rensing ved kolonne kromatografi med silika, alumiumoksid og omvendtfase kolonne. Samlet rå produkt ekstrakt ble rensed ved preparativ HPLC. LC-MS viste racematprodukt dannelse (RT=7,6 og 8,2 min.) ved m/z 813,2 (M+1) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og CID-MS spektrogram). ¹H NMR ble tatt, men ble ikke tolkbar på grunn av lite stoff mengde og mye TFAA innslag som ble vanskelig å dampe etter rensing ved preparativ HPLC (se vedlagt ¹H NMR spekter).

7.15 Syntese av forbindelse 15 (11-15)

Forbindelse **15**, N-Boc-L-alanin-L-alanin-L-asparagin-L-valin koblet med en sink-chelaterende-enhet, med molekylstruktur C₄₂H₅₈N₁₀O₈ og molekylvekt 830,97 g/mol, ble syntetisert etter følgende prosedyre (se **skjema 7.15**):



Skjema 7.15. Synteseskjema for forbindelse **15**.

N-Boc-NH₂-L-Ala-L-Ala-L-Asn-L-Val (1 eq) ble løst i DMF (0,5 mmol peptid per ml). NMM (1 eq) ble tilsatt reaksjonsblandingen med sprøyte og kanyle under nitrogen atmosfære og satt til omrøring i isbad. Sink-chelaterende forbindelse (1 eq), EDC (1,2 eq) og HOBt (1 eq) ble veid inn i et veieskip og tilsatt reaksjonsløsningen med litt DMF. Reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i isbad i 90 minutter og i romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble så fortynnet med vann (100 ml) og EtOAc (50 ml), og ekstrahert med EtOAc (5 x 50 ml). Samlet organisk fase ble vasket med 1 M HCl (2 x 50 ml), mettet NaCl-løsning (50 ml) og 1 M NaHCO₃ (2 x 50 ml), og tørket over MgSO₄ (s). Tørkemiddel ble filtrert bort og løsning ble dampet til tørrhet på rotavapor og vakuumpumpe.

Syntesen ble utført 1 gang på 0,05 grams skala. Prosentvis utbytte ble 34 %. LC-MS viste uren UV kromatogram, men produktdannelse (RT=8,7-9,2 min.) ved m/z 831,5 (M+1) i massespektrogrammet (se vedlagt UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram). ¹H NMR ble ikke tatt.

7.16 *In vitro* eksperiment av spaltning av prodrug

Eksperimentet for å teste spaltning går ut på å løse opp prodrug i buffer og deretter tilsette legumain for å se om prodrug spaltes. 1 M NaOH ble benyttet for å deaktivere enzymet etter inkubasjon. Spaltning ble monitorert ved HPLC. Inkubasjonsforsøk med prodrug-forbindelse 14 og legumain ble utført etter følgende prosedyre:

Prodrug (4 mg) ble løst i acetatbuffer (4 ml, 50 nM, pH = 5,0), dette gir en konsentrasjon på 1,5 mg/ml tilsvarende 1230 µM. To umiddelbare uttak (600 µl) ble tatt ut fra oppløst prodrug for 0-prøve kontroll på intakt prodrug. Det ene ble tilsatt 1 M NaOH (12 µl) og analysert straks. Det andre ble analysert uten base tilsetning først, og en gang til etter 24 timer og etter tilsetning av 1 M NaOH (12 µl). Legumain-ekstrakt (50 µl) ble tilsatt prodrug-løsningen og blandet. Legumain-prodrug blandingen ble inkubert ved romtemperatur. Det ble det tatt uttak (600 µl) ved tid : 10 minutter, 1 time, 3 timer og til slutt 24 timer. Alle prøver ble deaktivert med 1 M NaOH (12 µl) og analysert ved HPLC:

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. Prøve-0-m/base | buffer m/prodrug + base |
| 2. Prøve-0-u/base | buffer m/prodrug uten base |
| 3. Prøve-0-u/base-24 timer | buffer m/prodrug i 24 timer + base |
| 4. Prøve-1-10 min. | buffer m/prodrug + legumain etter 10 min. + base |

- | | |
|---------------------|---|
| 5. Prøve-2-1 time | buffer m/prodrug + legumain etter 1 time + base |
| 6. Prøve-3-3 timer | buffer m/prodrug + legumain etter 3 timer + base |
| 7. Prøve-4-24 timer | buffer m/prodrug + legumain etter 24 timer + base |

I tillegg ble det tatt en prøve med valin-colchicin i buffer med prodrug og legumain for å få et spekter av spaltet prodrug i sammenlignbar elutingssystem.

- | | |
|------------------|---|
| 8. Val-colchicin | buffer m/prodrug + legumain + valin-colchicin |
|------------------|---|

Litteraturliste

ATCC®. **293 [HEK-293]**. American Type Culture Collection - ATCC-LGC Standards (2012). ATCC number CRL-1573. www.lgcstandards-atcc.org (26.04.2012).

Bagley BC og Kerr DJ. **Anticancer Drug Development - Cell Death Pathways as Targets for Anticancer Drug**. Academic Press (2002). 55-76.

Bagley BC og Kerr DJ. **Anticancer Drug Development - Tumor Vasculature as Target**. Academic Press (2002). 123-136.

Bajjuri KM, Liu Y, Liu C og Sinha SC. **The Legumain Protease-Activated Auristatin Prodrug Suppress Tumor Growth and Metastases without Toxicity**. ChemMedChem (2011). 6; 54-59.

Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C og Barret AJ. **Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase**. Journal of Biological Chemistry. (1997) 272; 8090–8098.

Chen JM, Fortunato M og Barrett AJ. **Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue**. Biochemical Journal (2000). 352 (2); 327-34.

Donadelli M, Pozza ED, Costanzo C, Scupoli MT, Scarpa A og Palmieri M. **Zink Depletion Efficiently Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth by increasing the Ratio of Antiproliferative/ Proliferative Genes**. Juornal of Cellular Biochemistry (2008). 104; 202-212.

El-Faham A og Albericio F. **COMU: A third generation of uranium-type coupling Reagents**. Journal of Peptide Science. (2010). 16; 6-9.

El-Faham A, Subiros-Funosas R, Prohens R og Albericio F. **COMU: A Safer and More Effective Replacement for Bezotriazole-Based Uronium Coupling Reagents**. Chemistry - A European Journal (2009). 15; 9404-9416.

Gawenda J, Traub F, Lück HJ, Kreipe H og Wasielweski RV. **Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients**. Breast Cancer Research and Treatment (2007). 102; 1-6.

Hanhong. **N-boc-L-asparagine**. Hanhong Laboratory Chemicals (2012). 00308.
www.hanhonggroup.com (24.04.12).

Isidro-Llobet A, Alvarez M og Albericio F. **Amino Acid-Protecting Groups**. Chemical Reviews (2009). 109 (6), 2455-2504.

Kierulf P. **Aminosyrer**. Store Norske Leksikon (2011). www.snl.no (10.03.2011).

Kofstad PK og Pedersen B. **Sink**. Store Norske Leksikon (1997). www.snl.no (09.03.2012)

Lebeau L, Ducray P og Mioskowski C. **Simple and Efficient Conversion of Colchicine Into Deacetylcolchicine**. Synthetic Communications (1997). 27 (2); 293-296.

Li P og Xu J-C. **HOBt and HOAt-derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis**. Tetrahedron Letters (2000). 41; 5; 29; 721–724.

Liu C. **Legubicin a Tumor-activated Prodrug for Breast Cancer Therapy**. US Army Medical Research Report (2008). Report Number: W81XWH-05-1-0318.

Liu C, Sun C, Huang H, Janda K, Edgington T. **Overexpression of legumain in tumor is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy**. Cancer Research (2003). 63; 2957-2964.

Sjöström M, Kolman A, Clemedson C og Clothier R. **Estimation of human blood LC50 values for use in modeling of *in vitro*–*in vivo* data of the ACuteTox project**. Toxicology in Vitro (2008). 22; 5; 1405–1411.

Montalbetti CAGN og Falque V. **Amide bond formation and peptide coupling**. Tetrahedron 61 (2005). 10827–10852.

Müntz K, Blattner FR og Shutov AD. **Legumains – a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propolypeptide processing and protein breakdown in plants.** Journal of Plant Physiology. (2002) 159; 1281-1293

Murthy RV, Arbman G, Gao J, Roodman GD og Sun XF. **Legumain Expression in Relation to Clinicopathologic and Biological Variables in Colorectal Cancer.** Clinical Cancer Research (2005). 11; 2293-2299.

Nakatani T, Tawaramoto M, Kennedy DO, Kojima A og Matsui-Yuasa. **Apoptosis induced by chelation of intracellular zink is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes.** Chemico-Biological Interactions (2000). 125; 151-163.

Promega®. **CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS).** Promega® Technical Bulletin. www.promega.com (23.02.2011).

Samuelsson G og Bohlin L. **Drugs of Natural Origin – A Treatise of Pharmacognosy - Amino alkaloids.** Apotekarsocieteten, Stockholm, Sweden (2009). 609-622.

Solomons TWG og Fryhle CB. **Organic chemistry - Amino Acids And Proteins.** John Wiley & Sons In Corporation, New York (2009). 1107-1148.

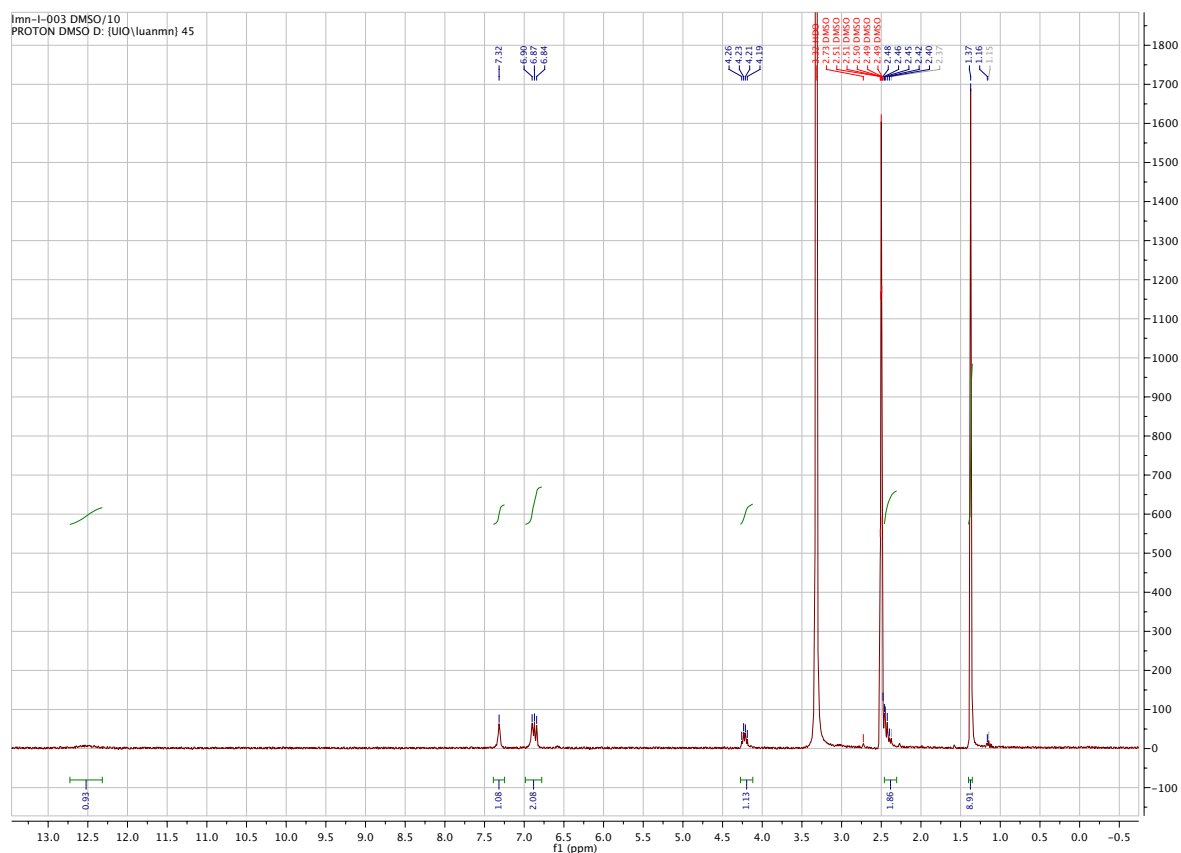
Subiros-Funosas R, Prohens R, Barbas R, El-Faham A og Albericio F. **OXYMA: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Bezotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion.** Chemistry - A European Journal (2009). 15; 9384-9403.

Williams A og Ibrahim IT. **A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3'-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC).** Journals - American Chemical Society (1981). 103 (24). 7090–7095.

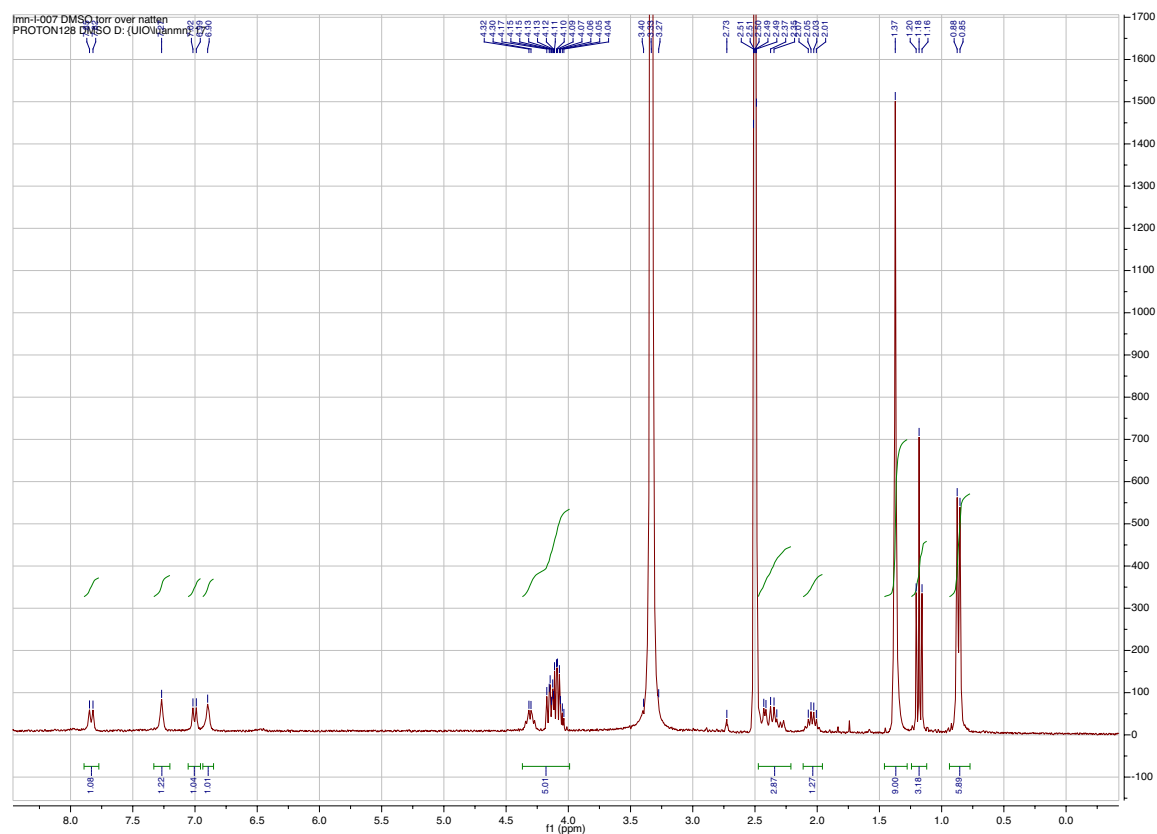
Wu W, Luo Y, Sun C, Liu Y, Kuo P, Varga J, Xiang R, Reisfeld R, Janda KD, Edgington TS og Liu C. **Targeting Cell-Impermeable Prodrug Activation to Tumor Microenvironment Eradicates Multiple Drug-Resistant Neoplasms.** Cancer Research. (2006). 66; 970-980.

Vedlegg

^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 2



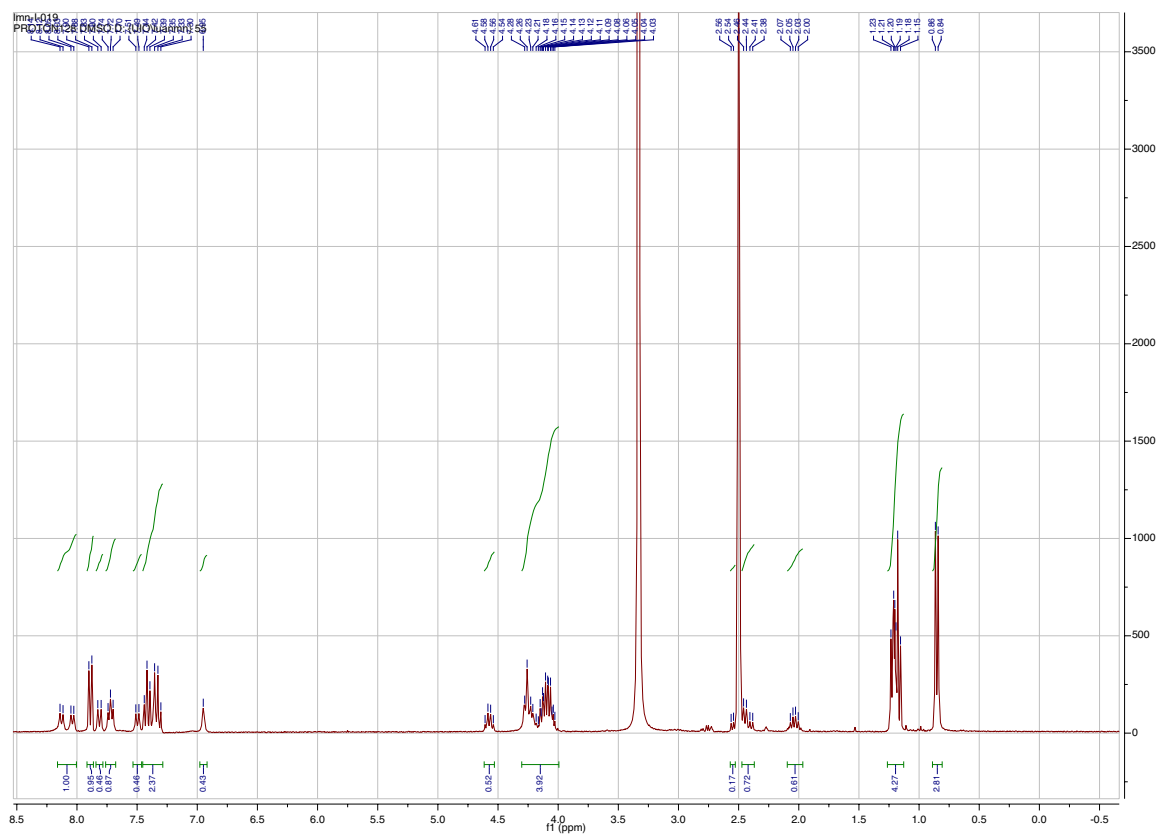
^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 3



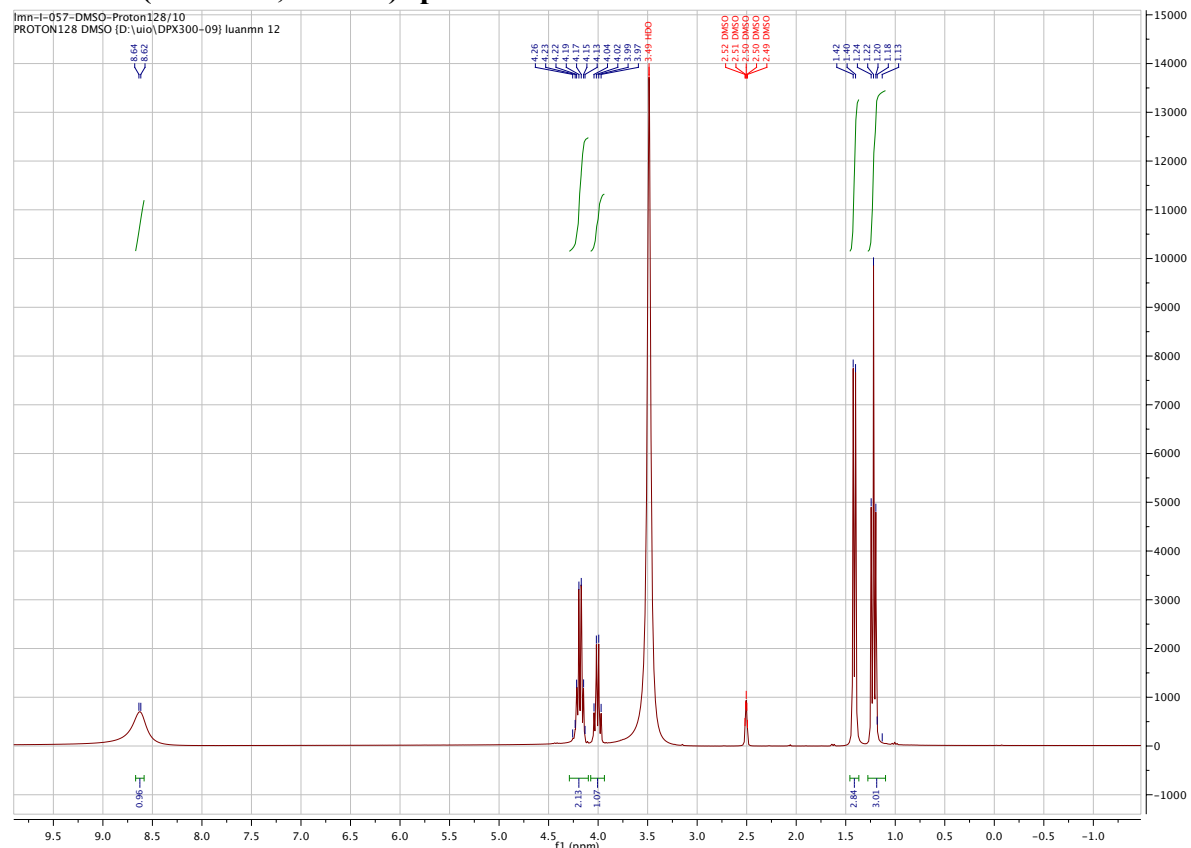
^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 4



^1H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 5



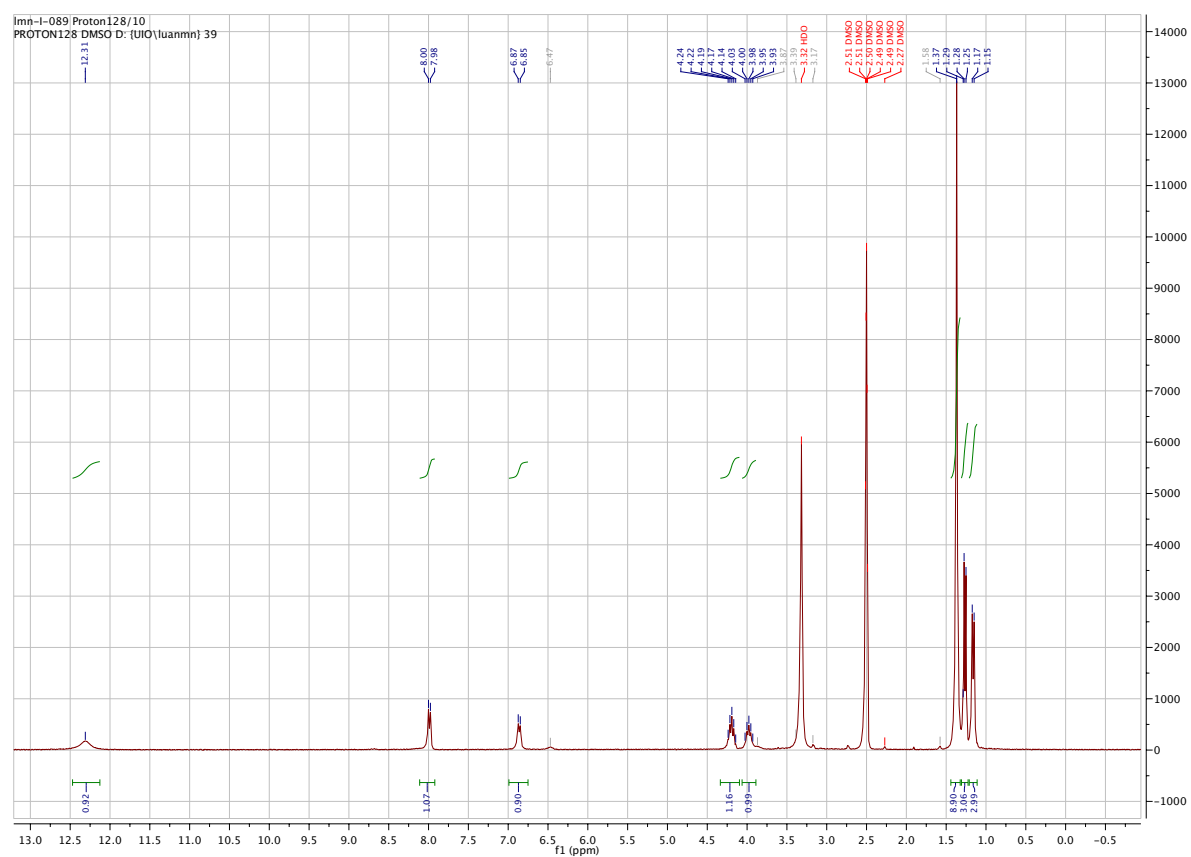
¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 7



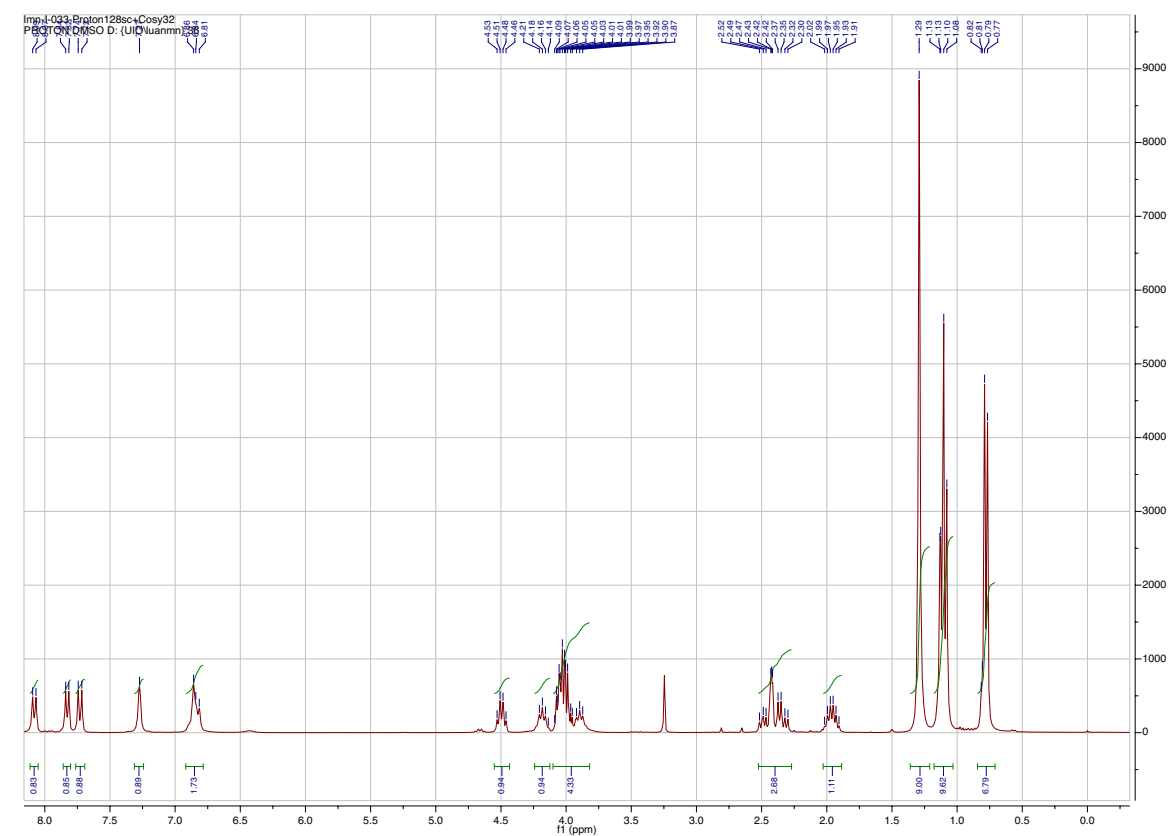
¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 8



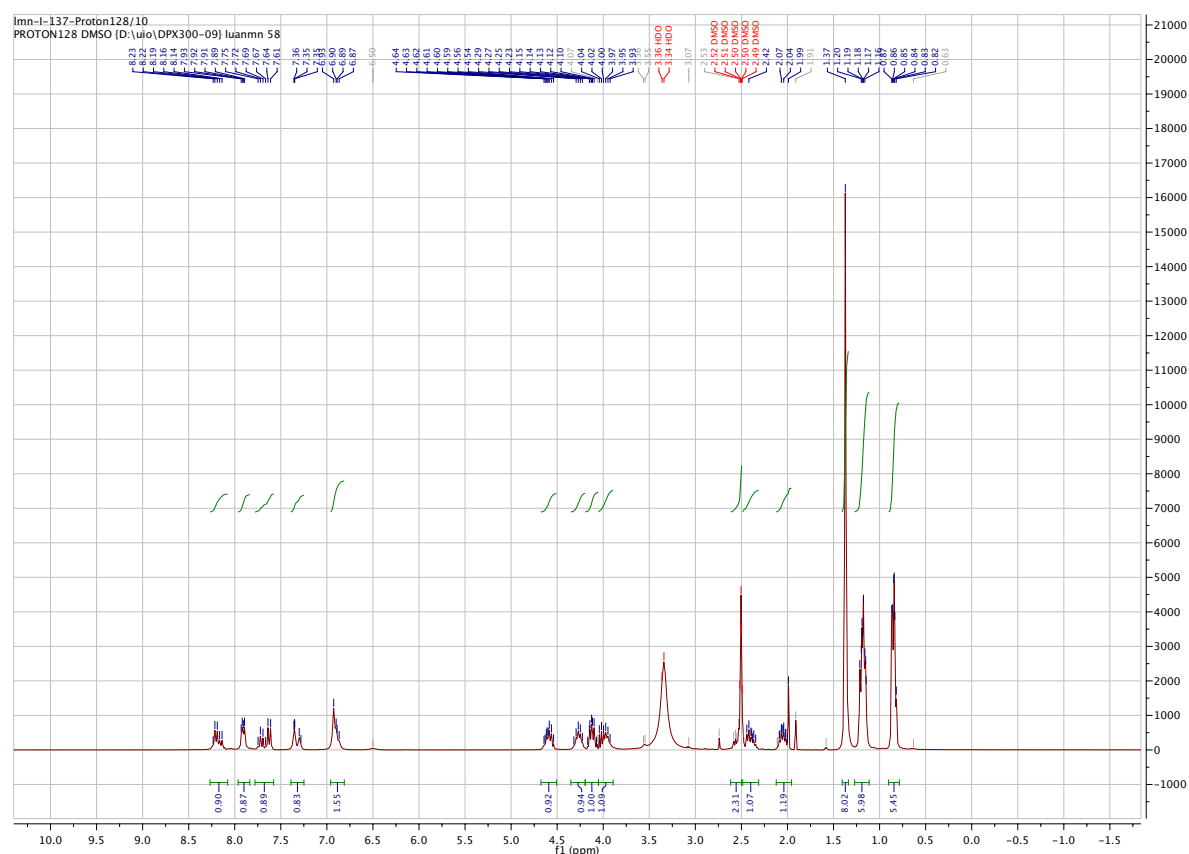
¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 9



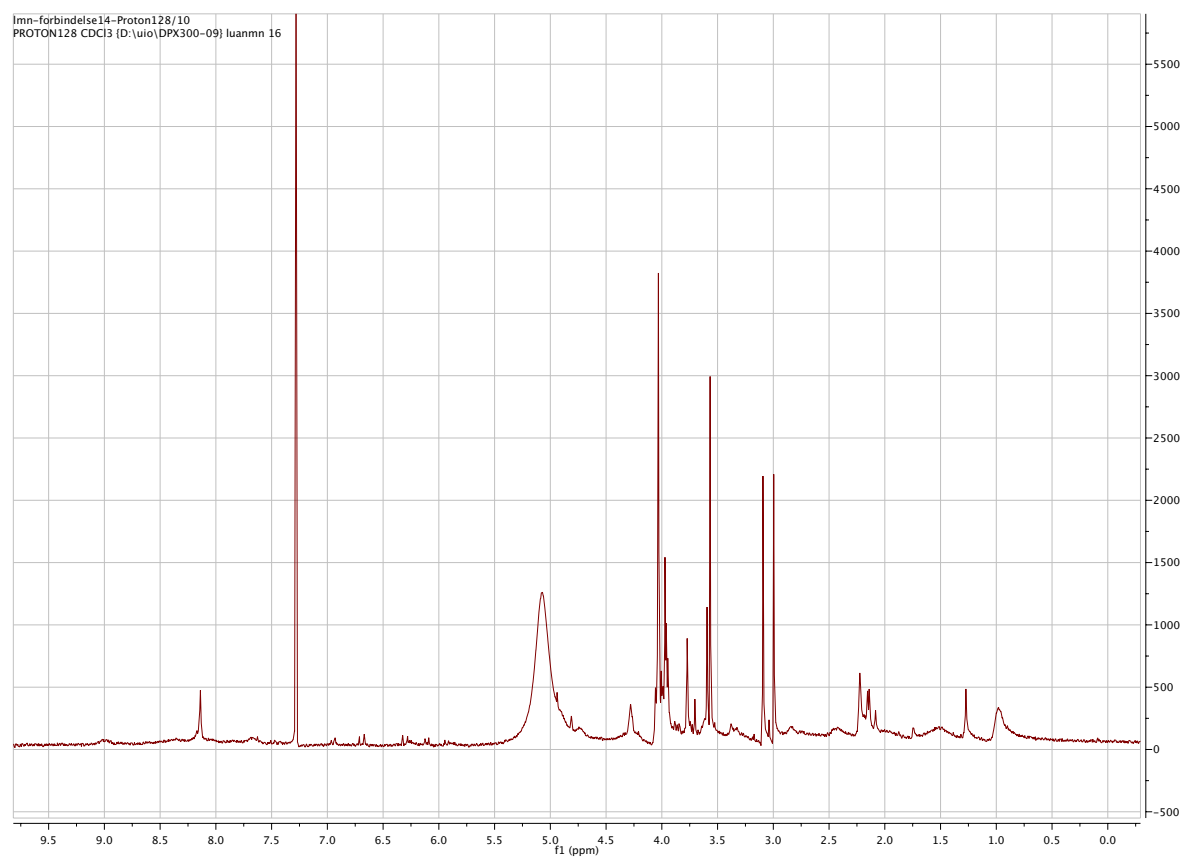
¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 10

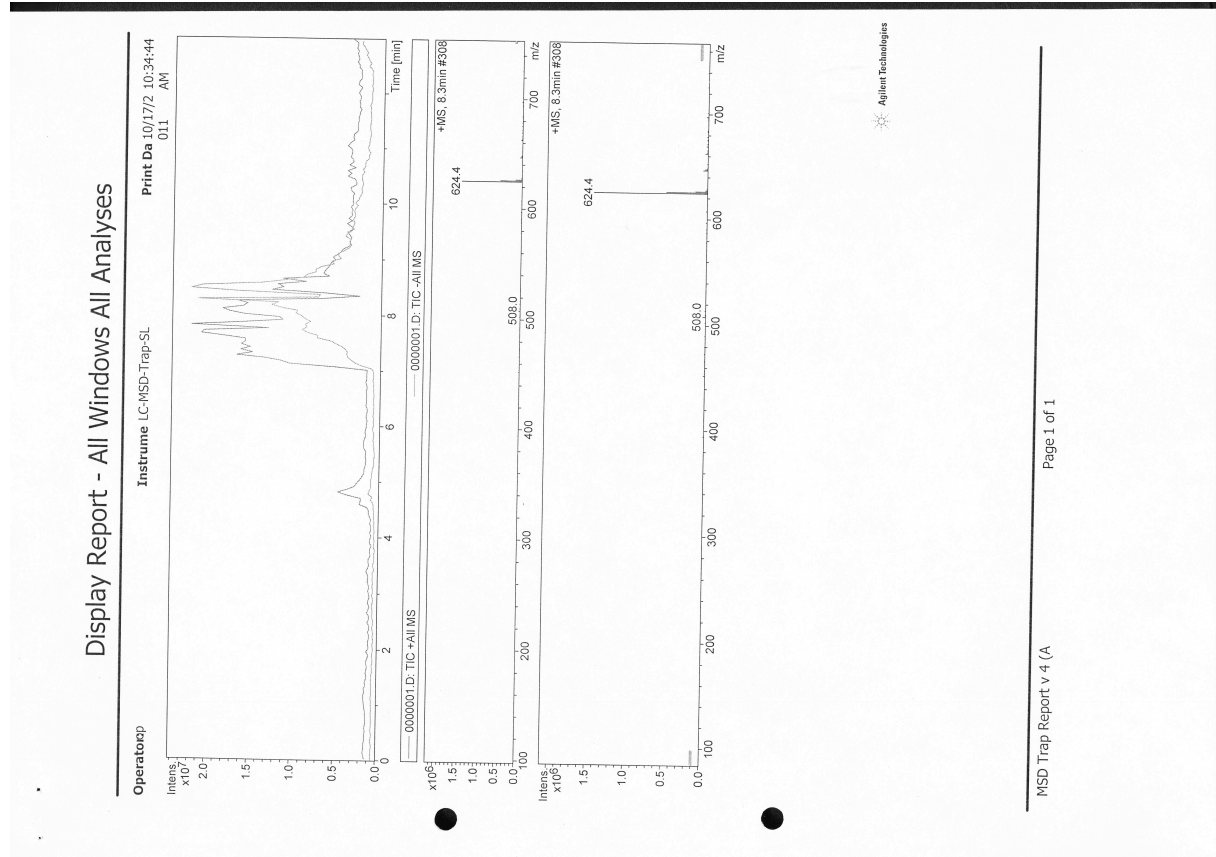


¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 11

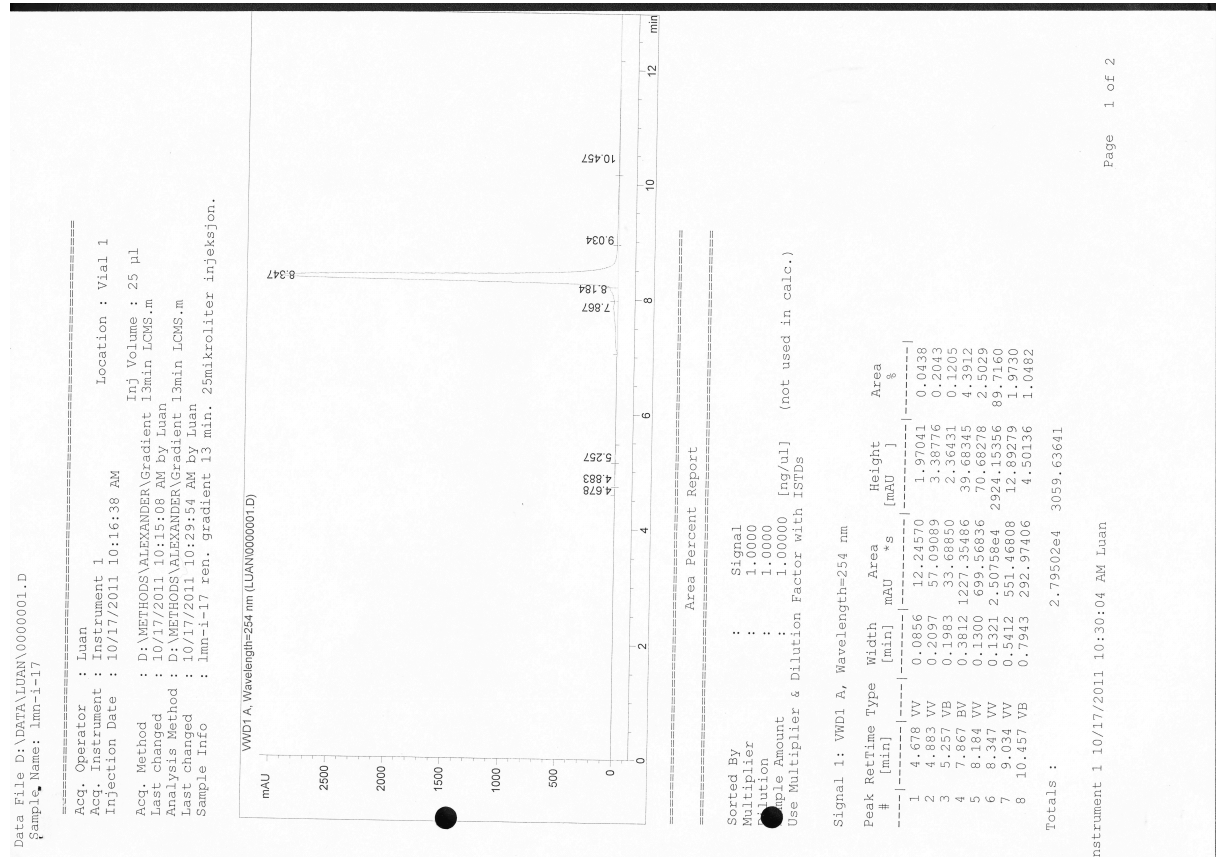


¹H NMR (300 MHz, DMSO) spekter av forbindelse 14

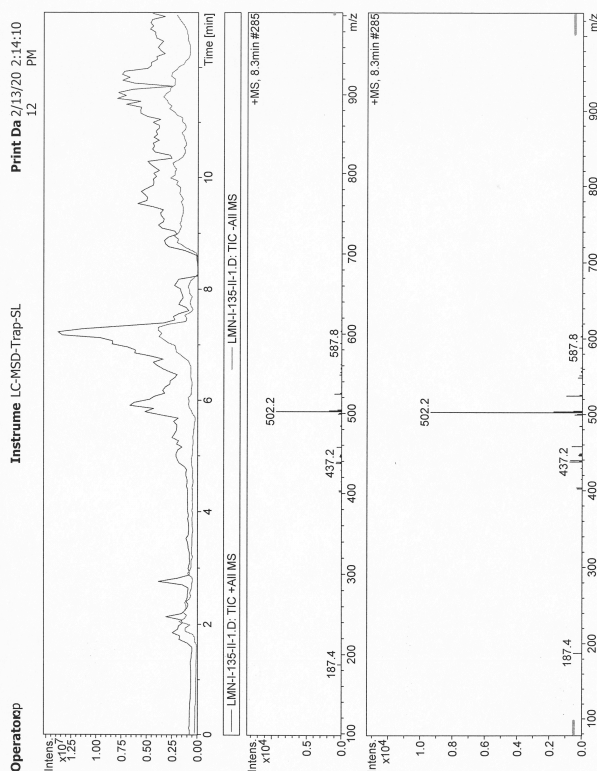




UV chromatogram og tilhørende MS spektrogram for forbindelse 5

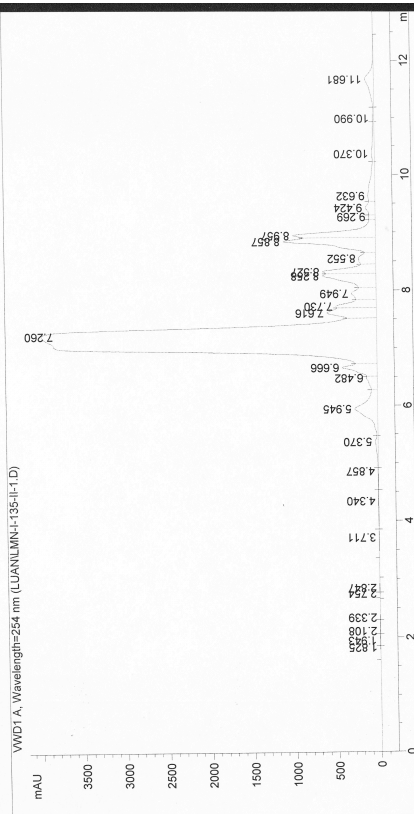


Display Report - All Windows All Analyses


Agilent Technologies

Data File D:\DATA\LUAN\LMN-I-135-II-1.D
Sample Name: lmn-I-135-II-1

Acq. Operator : Luan Location : Vial 2
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date : 2/13/2012 : 14:08 PM
Acq. Method : D:\DATA\LUAN\I-135-T-1 Inj Volumes : 25 µl
Sample Name : D:\DATA\LUAN\I-135-T-1.D Gradient 13 min LCMS Luan.m
Analysis Method : D:\DATA\LUAN\I-135-T-1.D Gradient 13 min LCMS Luan.m
Sample Info : 2/13/2012 : 14:42 PM by Luan
Sample Name : lmn-I-135-II-1 13 min gradient LCMS



Area Percent Report

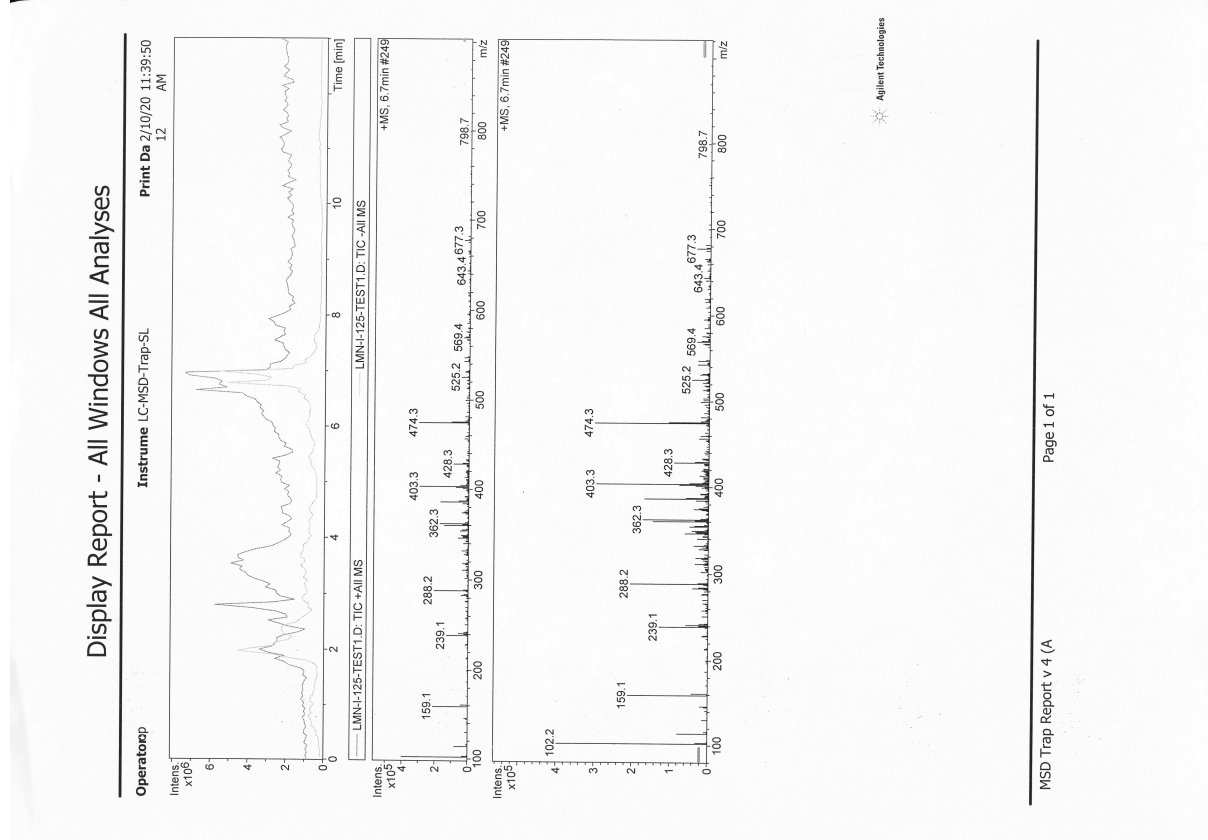
Sorted By	:	Signal
Multiplier	:	1.0000
Dilution	:	1.0000
Sample Amount	:	1.00000 [ng/ul]
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs	:	(not used in calc.)

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

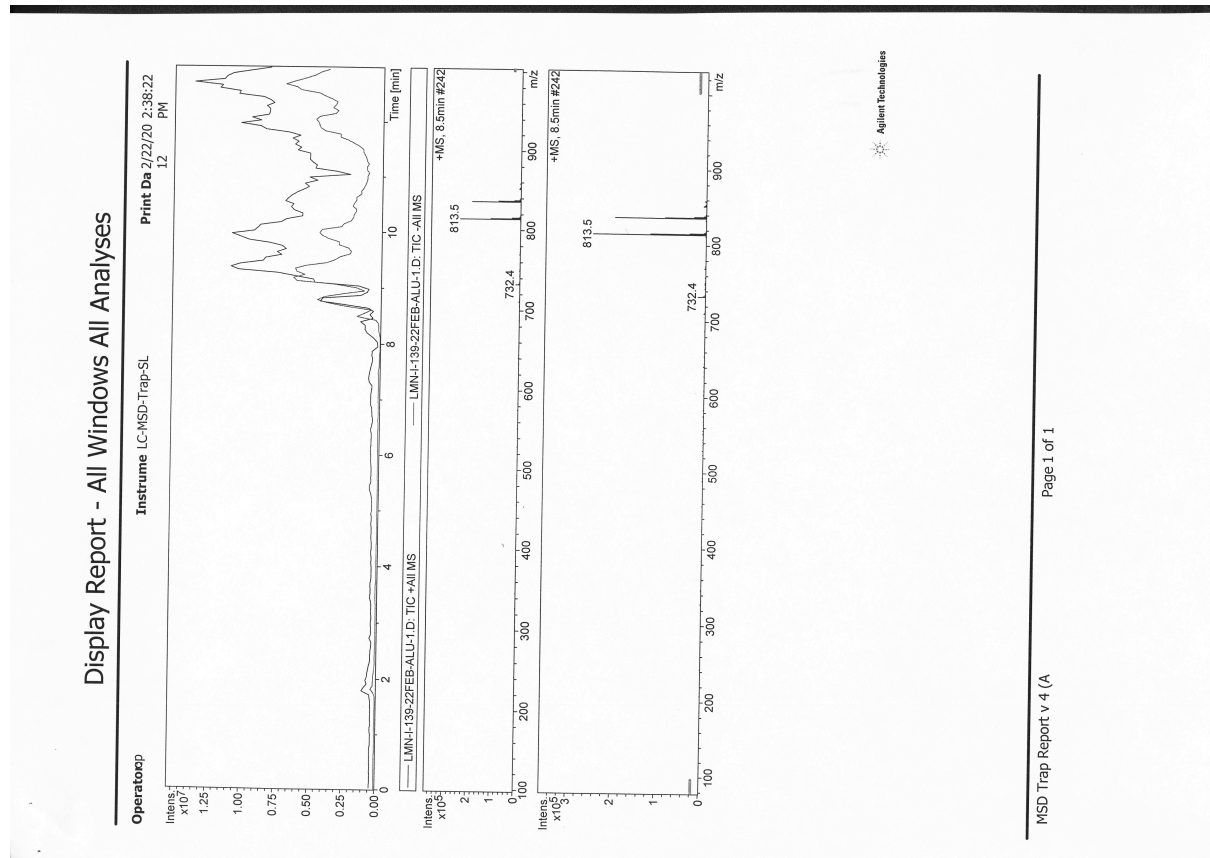
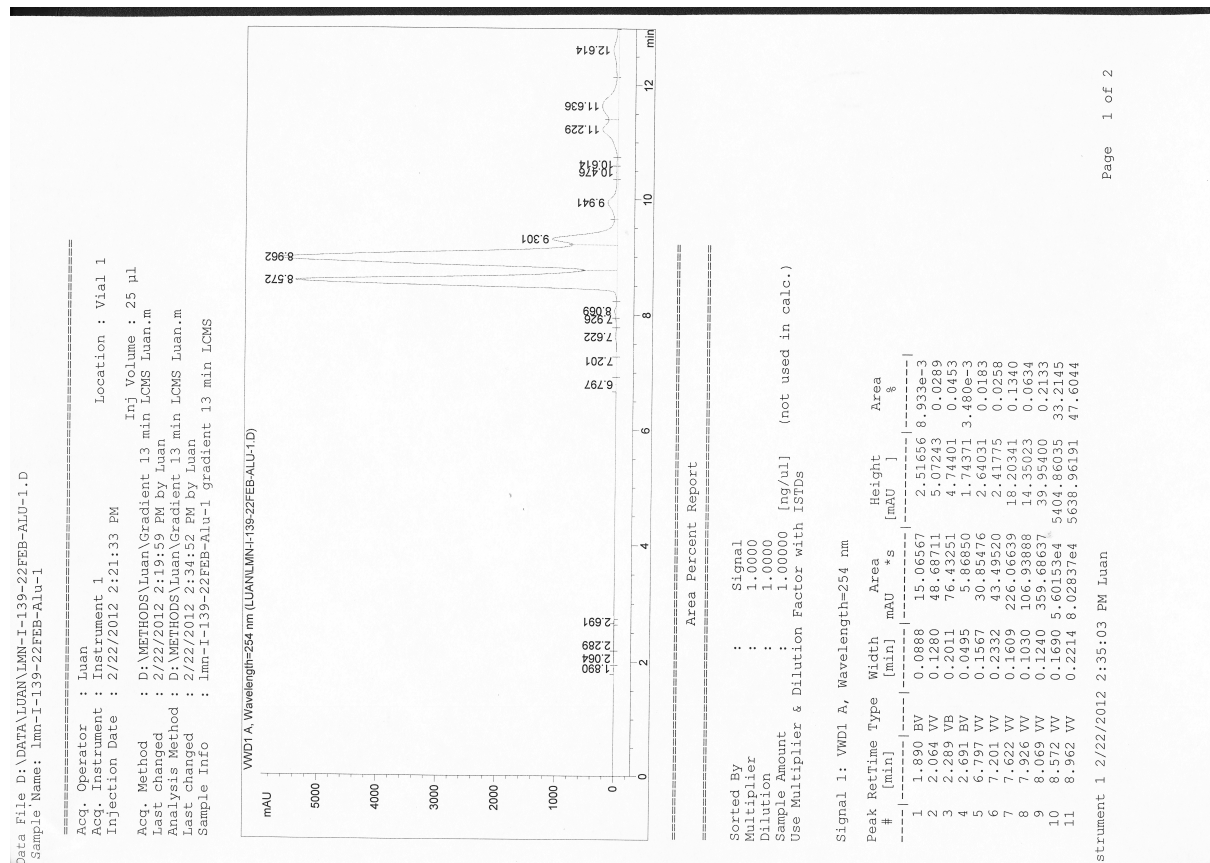
Peak #	ReTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	1.823	BV	0.0838	18.00000	2.91204	0.0107
2	1.983	BV	0.0827	58.42186	9.39717	0.0347
3	2.198	BV	0.1265	45.34723	4.72106	0.0269
4	2.339	BV	0.1772	24.13219	1.96379	0.0143
5	2.734	BV	0.0479	6.22180	1.92479	3.693e-3
6	2.877	BV	0.1536	30.66610	2.87305	0.0182
7	3.711	UV	0.2516	64.15368	3.92045	0.0381
8	4.450	UV	0.0467	129.14198	4.68440	0.0767
9	4.857	UV	0.2186	117.97343	8.36662	0.0700
10	5.345	UV	0.1917	574.36371	33.13691	0.3410
11	5.905	UV	0.2577	5412.83545	271.07222	3.2133

Instrument 1 2/13/2012 1:54:54 PM Luan

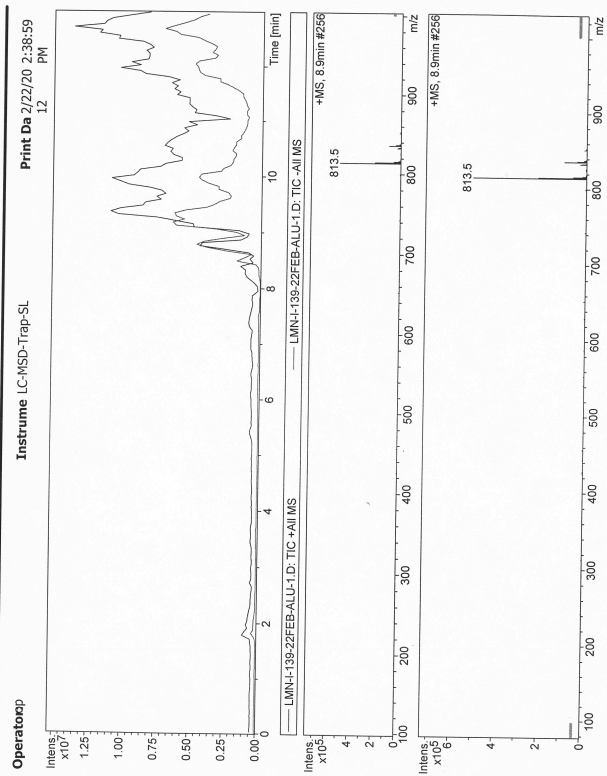
60



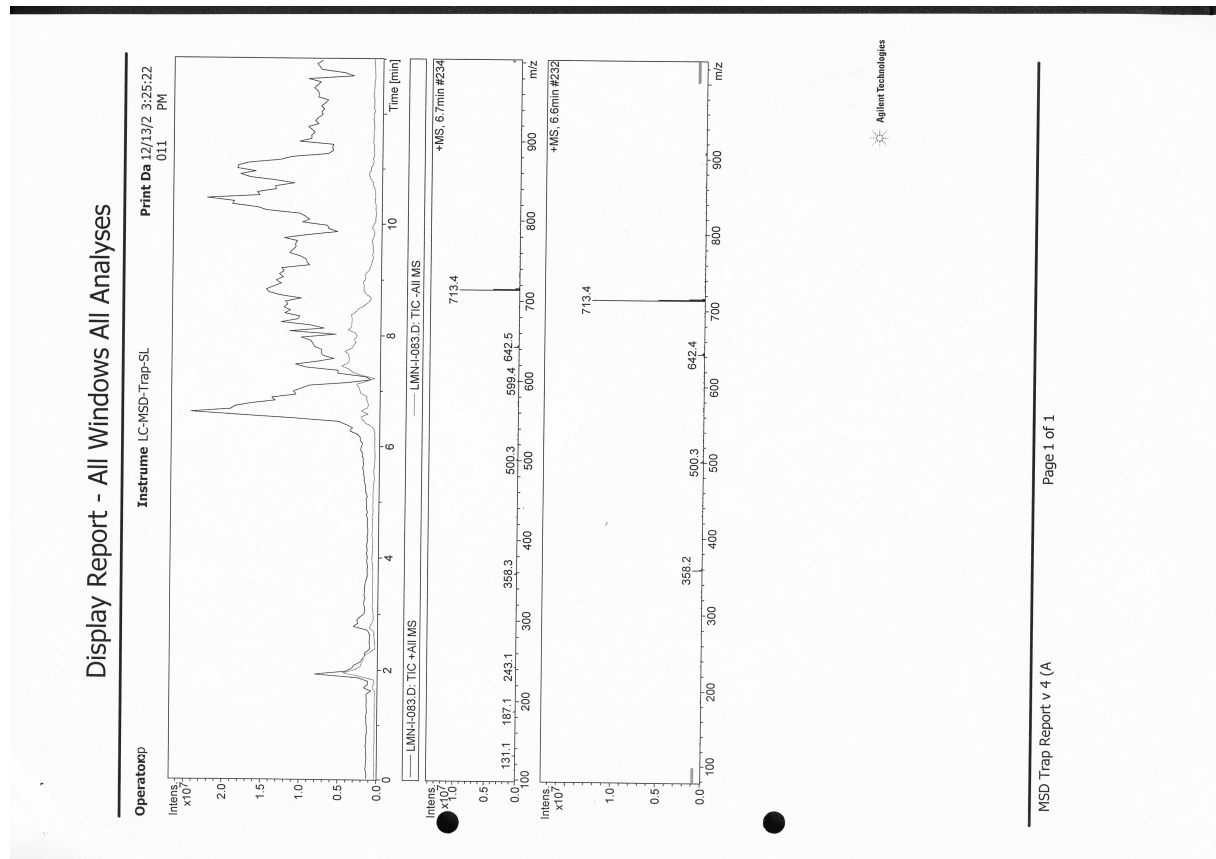
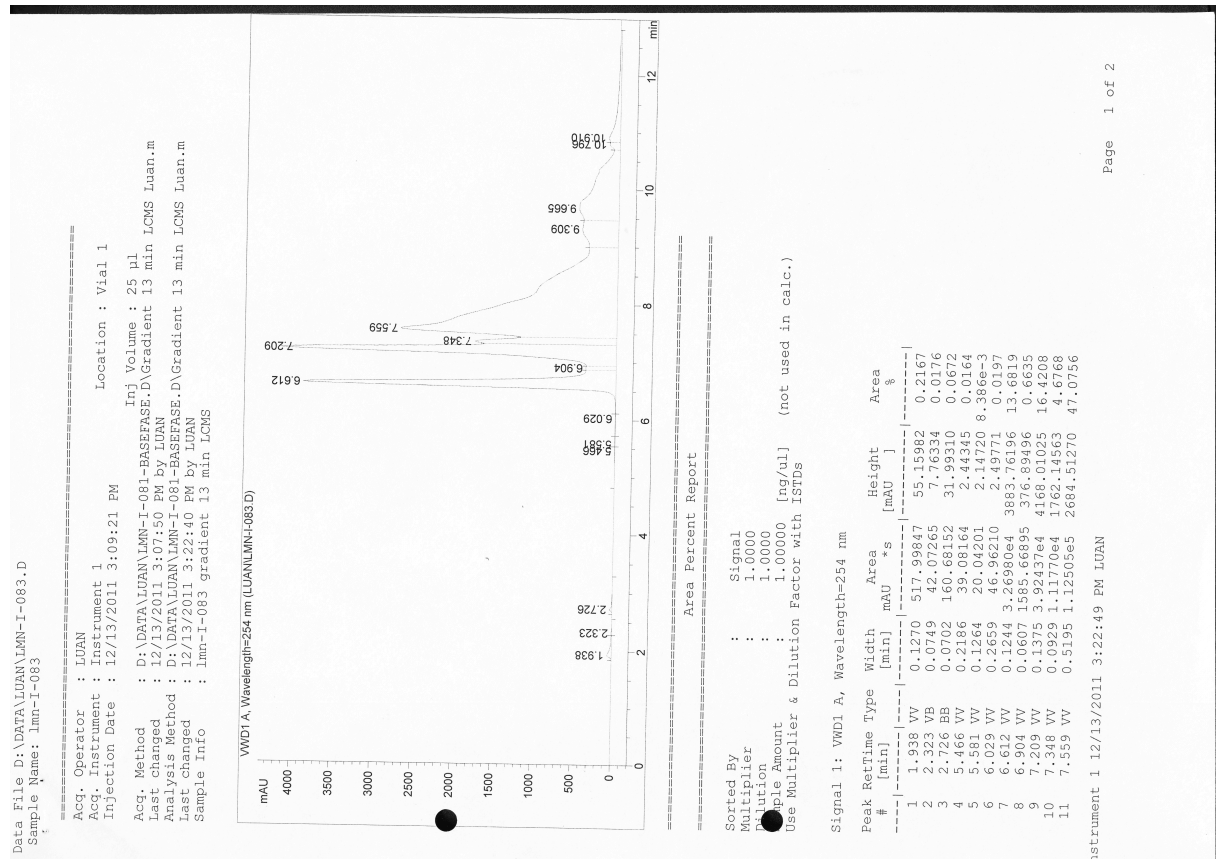
UV kromatogram og tilhørende MS spektrogrammer for forbindelse 12



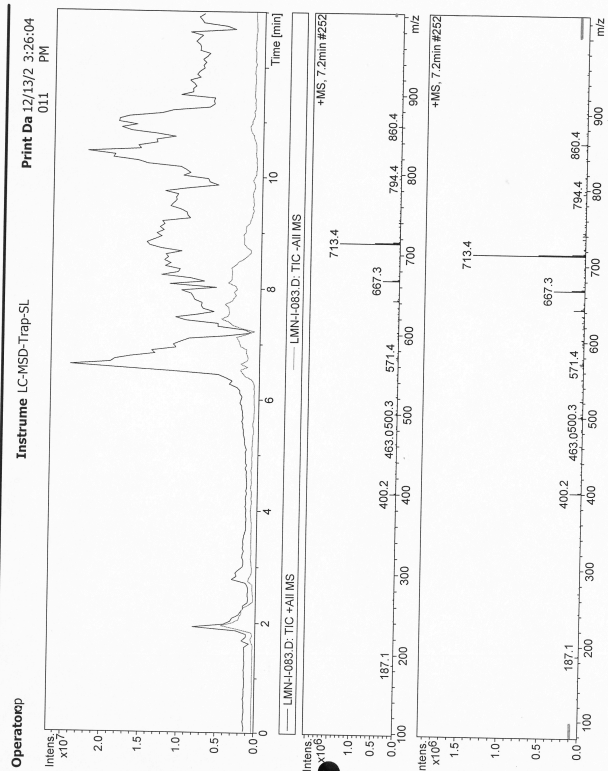
Display Report - All Windows All Analyses



UV kromatogram og tilhørende MS spektrogrammer for forbindelse 13



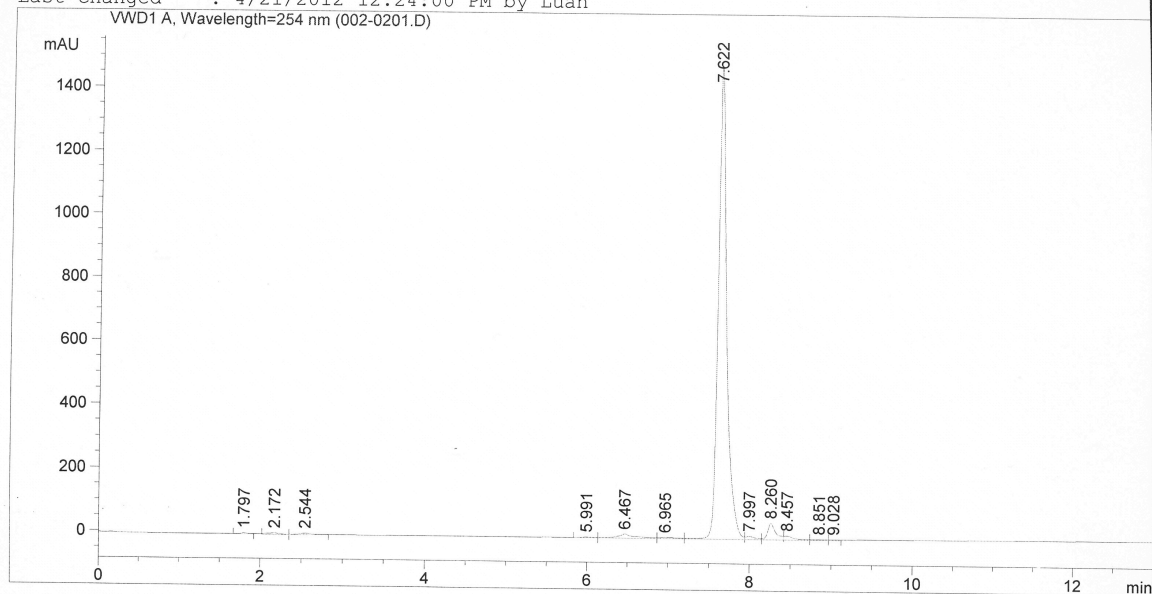
Display Report - All Windows All Analyses



UV kromatogram for forbindelse 14

Data File D:\DATA\002-0201.D
Sample Name: 2-33

```
=====
Acq. Operator   : Luan                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 2
Injection Date  : 4/21/2012 12:10:46 PM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 25 µl
Sequence File   : D:\SEQUENCE\SEKVEN 10 PROVER GRADIENT 13 MIN.S
Acq. Method     : D:\METHODS\Luan\GRADIENT 13 MIN LCMS LUAN.M
Last changed    : 4/21/2012 12:08:58 PM by Luan
Analysis Method : D:\METHODS\Luan\GRADIENT 13 MIN LCMS LUAN.M
Last changed    : 4/21/2012 12:24:00 PM by Luan
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 25.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

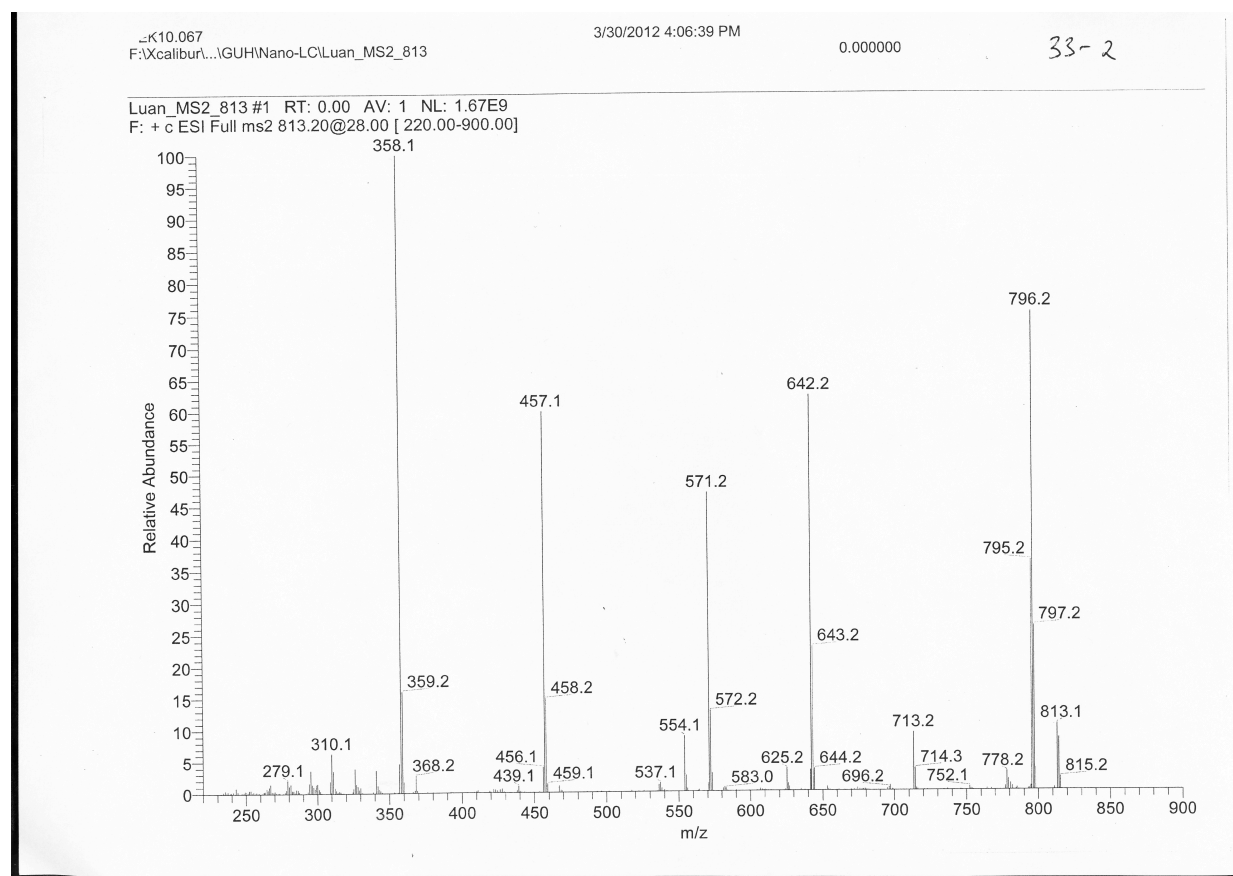
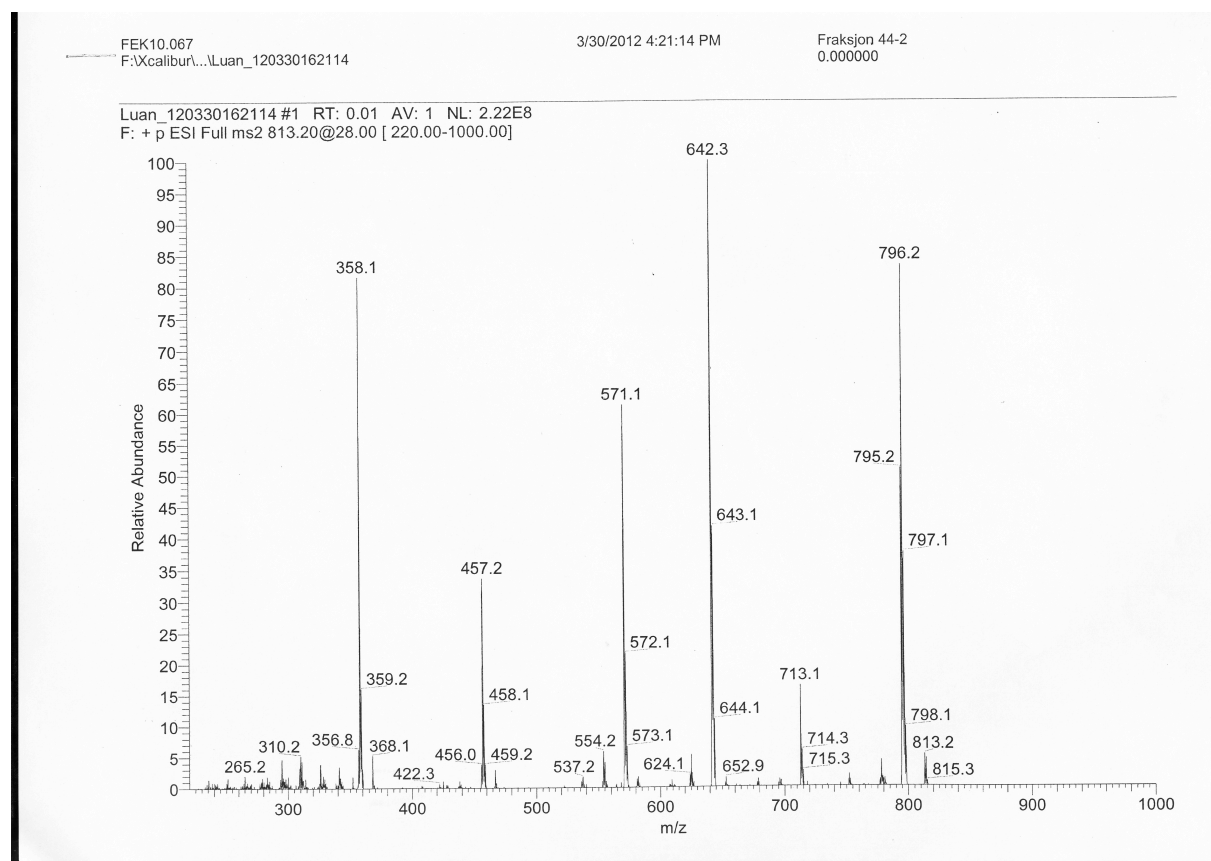
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.797	BV	0.0842	21.15547	3.47359	0.1801
2	2.172	VV	0.1301	53.30020	5.31432	0.4537
3	2.544	VB	0.1577	54.16434	4.86112	0.4611
4	5.991	BV	0.1315	19.96779	2.09601	0.1700
5	6.467	VV	0.1952	199.53926	13.20573	1.6986
6	6.965	VV	0.1927	54.55958	3.63316	0.4644
7	7.622	VV	0.1029	1.07329e4	1491.91833	91.3622
8	7.997	VV	0.1105	82.86742	10.38915	0.7054
9	8.260	VV	0.1005	360.76297	51.60508	3.0709
10	8.457	VB	0.1295	113.46320	12.29459	0.9658
11	8.851	BV	0.1819	33.62232	2.56786	0.2862
12	9.028	VV	0.1248	21.32669	2.38396	0.1815

Instrument 1 4/21/2012 12:24:12 PM Luan

Page 1 of 2

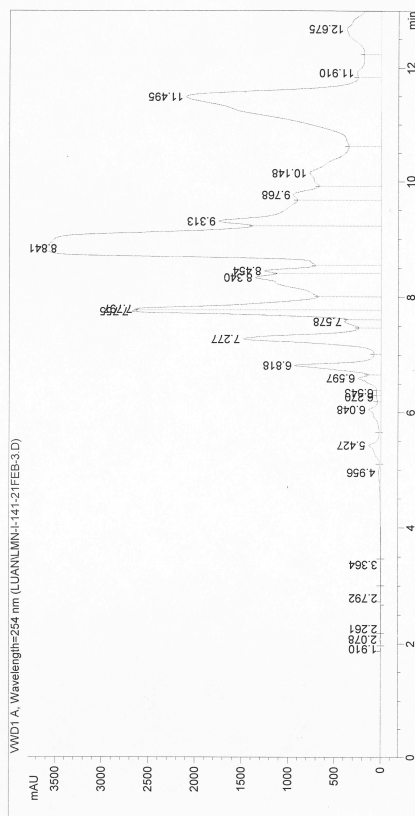
CID-MS spektrogram for forbindelse 14



UV kromatogram og tilhørende MS spektrogram for forbindelse 15

sta. File:D:\DATA\LUAN\LMN-I-141-21FEB-3.D
Sample Name: lmn-I-141-21feb-3

Acq. Operator : Luan
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date : 2/21/2012 1:09:32 PM
Location : Vial 1
Inj Volume : 25 µl
Acq. Method : D:\METHODS\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last changed : 2/21/2012 1:07:48 PM by Luan
Analysis Method : D:\METHODS\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last changed : 2/21/2012 1:22:48 PM by Luan
Sample Info : lmn-I-141-21feb-3



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU]	*s	Height [mAU]	Area %
1	1.910	WV	0.0663	7.59629		1.81513	2.053e-3
2	2.078	WV	0.1019	46.57642		6.21981	0.0126
3	2.261	VB	0.2875	80.33648		3.49001	0.0217
4	2.792	BB	0.1694	41.95133		3.10293	0.0113
5	3.364	BV	0.3367	70.60378		2.69070	0.0191
6	4.956	WV	0.4279	911.64874		26.67398	0.2464
7	5.427	WV	0.1791	1820.61328		131.42354	0.4920
8	6.048	WV	0.1791	1883.30811		134.70779	0.5090
9	6.279	WV	0.0864	235.24246		47.60031	0.0793
10	6.429	WV	0.0731	260.43140		49.03710	0.0704
11	6.597	WV	0.1167	2167.81226		247.57551	0.5859

Instrument 1 2/21/2012 1:23:00 PM Luan

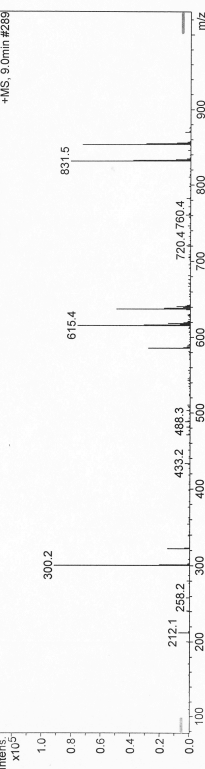
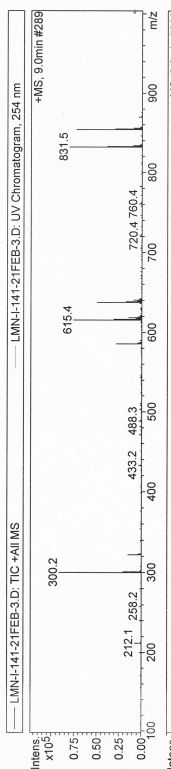
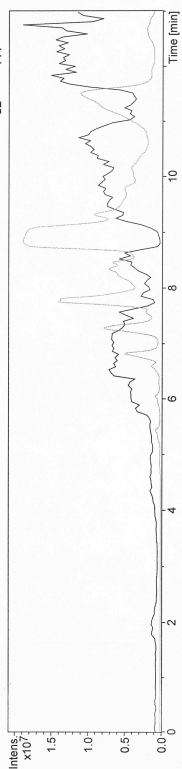
Page 1 of 2

Display Report - All Windows All Analyses

Instrument LC-MSD-Trap-SL

Operator

Print Da 3/15/20 2:17:18 PM



Agilent Technologies

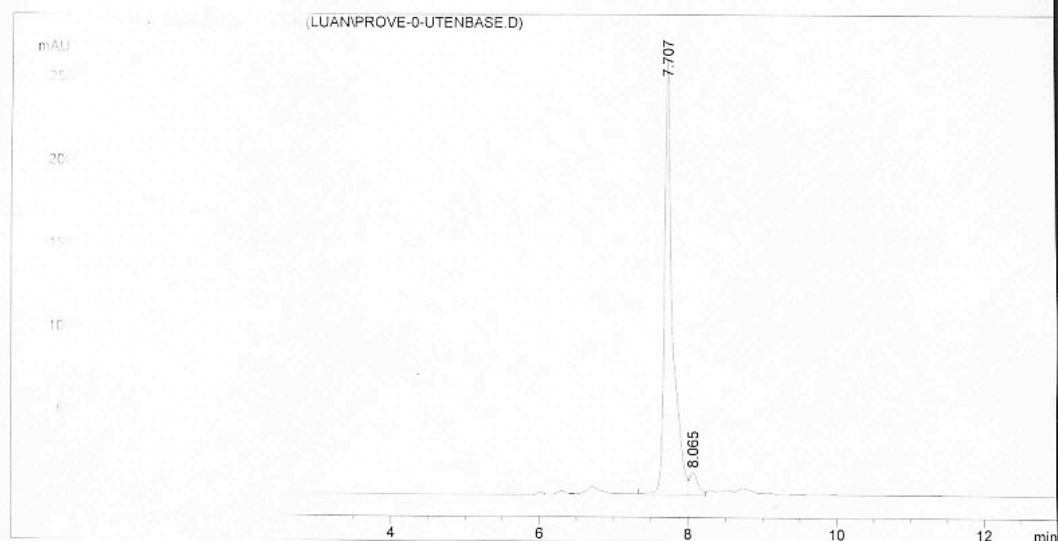
MSD Trap Report v 4 (A)

Page 1 of 1

UV kromatogram av Prøve-0-uten base (buffer m/prodrug)

Data File: LUANPROVE-0-UTENBASE.D
Sample Name: LUANPROVE-0-UTENBASE.D

=====
Acq. Method: LCMS
Acq. Date: 12/12/2012 12:16:19 PM Location: Vial 1
Inject Volume: 25 µl
Acq. Path: C:\MSDCHEM\100DS\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last Modified: 12/12/2012 12:14:46 PM by Luan
Analytical Path: C:\MSDCHEM\100DS\ALEXANDER\vask.m
Last Modified: 12/12/2012 2:16:06 PM by Luan
Sample Name: LUANPROVE-0-UTENBASE.D
Sample Path: LUANPROVE-0-UTENBASE.D
=====



=====
Area Percent Report
=====

Signal	Area	Height	Area %
1.0000	1.96128e4	2597.72388	94.8254
1.0000	1.070.27002	137.57384	5.1746

Sorted by: Signal
Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000
Sample Name: LUANPROVE-0-UTENBASE.D [ng/ul] (not used in calc.)
Use Method: LUANPROVE-0-UTENBASE.D Factor with ISTDs

Signal: LUANPROVE-0-UTENBASE.D Wavelength=254 nm

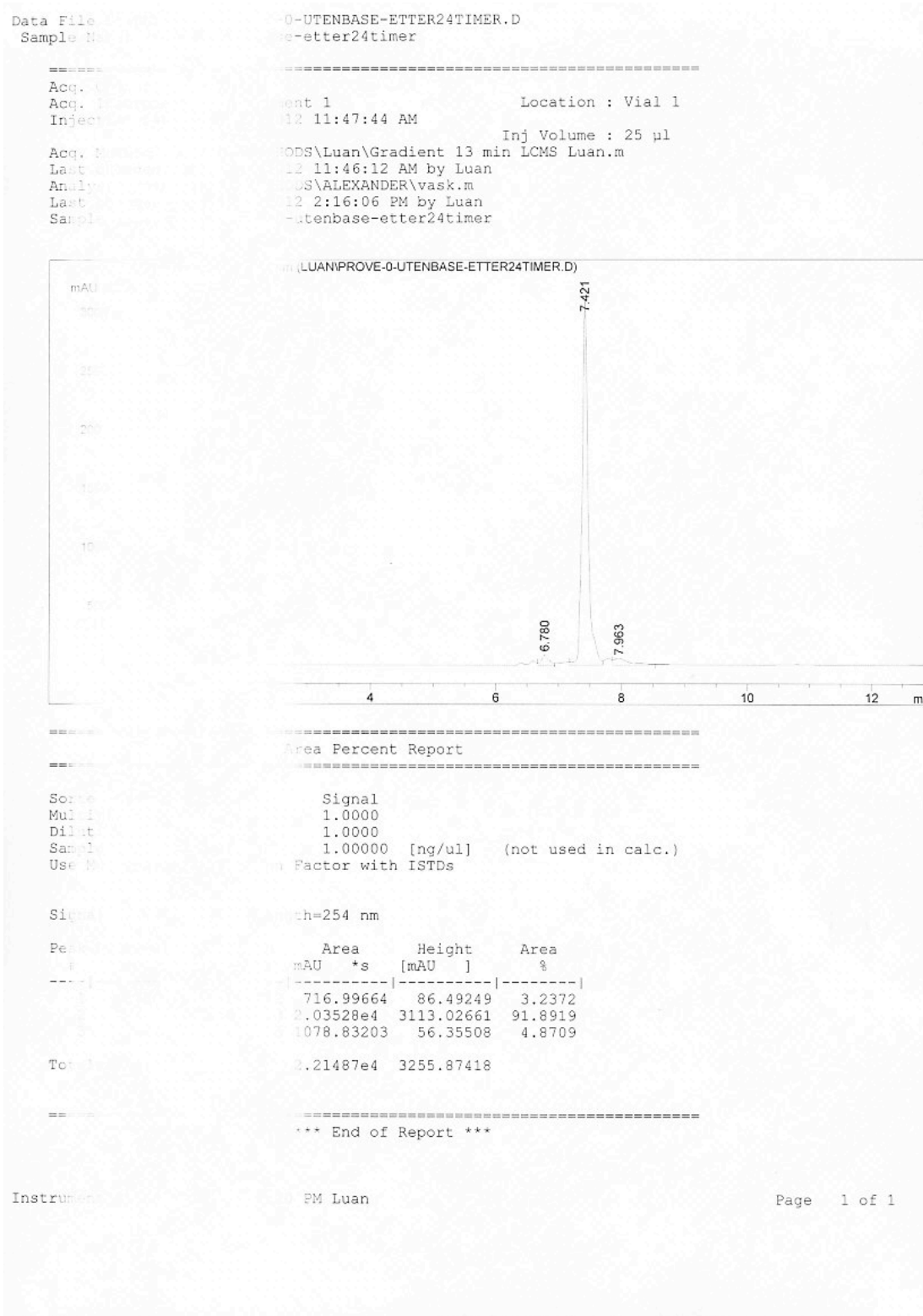
Peak #	Area (mAU*s)	Height (mAU)	Area %
1	1.96128e4	2597.72388	94.8254
2	1.070.27002	137.57384	5.1746
Total:	2.06830e4	2735.29771	

=====
*** End of Report ***

Instrument: 1200 HPLC
Date: 12/12/2012 12:16:19 PM Luan

Page 1 of 1

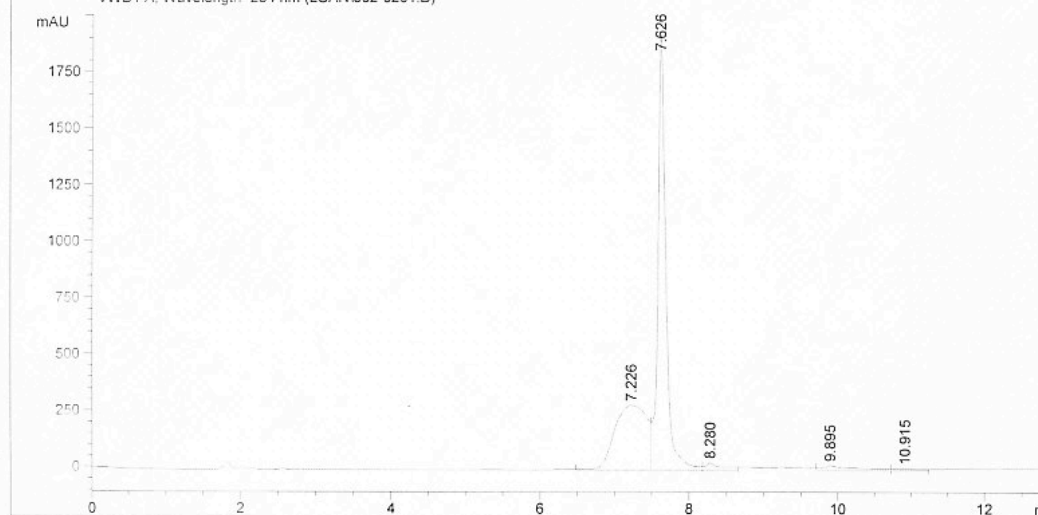
UV kromatogram av Prøve-0-uten base etter 24 timer (buffer m/prodrug)



UV kromatogram av Prøve-0-med base (buffer m/prodrug+base)

Data File D:\DATA\LUAN\002-0201.D
Sample Name: Legu+prodrug-0-prove-med base

```
=====
Acq. Operator   : Luan                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 2
Injection Date  : 4/25/2012 9:44:39 AM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 25 µl
Acq. Method     : D:\DATA\LUAN\PROVE-0-UTENBASE-ETTE24TIME-TILSBASE-2.D\GRADIENT 13 MIN LCMS
Last changed    : 4/25/2012 9:42:56 AM by Luan
Analysis Method : D:\METHODS\ALEXANDER\vask.m
Last changed    : 4/25/2012 11:31:27 AM by Luan
VWD1 A, Wavelength=254 nm (LUAN002-0201.D)
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 25.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	7.226	VV	0.4788	8560.86426	287.22894	35.2370
2	7.626	VV	0.1056	1.43120e4	1925.84351	58.9091
3	8.280	VV	0.2096	529.39435	32.39788	2.1790
4	9.895	VV	0.3918	681.38208	21.40271	2.8046
5	10.915	VV	0.3558	211.43852	7.35512	0.8703

Totals : 2.42951e4 2274.22816

*** End of Report ***

Instrument 1 4/25/2012 11:37:37 AM Luan

Page 1 of 1

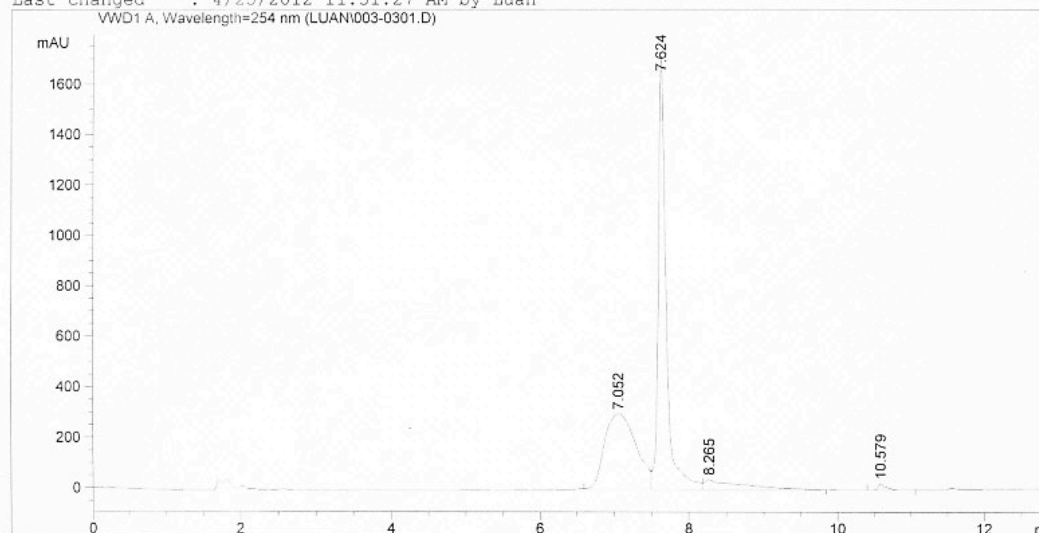
O med base

UV kromatogram av Prøve-1-Inkubert 10 min. (buffer m/prodrug+legumain)

Data File D:\DATA\LUAN\003-0301.D

Sample Name: Legu+prodrug-1-prove-med base-10min

```
=====
Acq. Operator   : Luan                      Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 3
Injection Date  : 4/25/2012 9:59:50 AM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 25 µl
Acq. Method     : D:\DATA\LUAN\PROVE-0-UTENBASE-ETTE24TIME-TILSBASE-2.D\GRADIENT 13 MIN LCMS
Last changed    : 4/25/2012 9:58:06 AM by Luan
Analysis Method : D:\METHODS\ALEXANDER\vask.m
Last changed    : 4/25/2012 11:31:27 AM by Luan
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 25.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	7.052	VV	0.4840	8890.03906	301.34665	38.4023
2	7.624	VV	0.1063	1.26553e4	1719.36072	54.6670
3	8.265	VV	0.4246	1436.96118	41.33042	6.2072
4	10.579	BB	0.0961	167.49416	24.38671	0.7235

Totals : 2.31498e4 2086.42449

*** End of Report ***

Instrument 1 4/25/2012 11:36:31 AM Luan

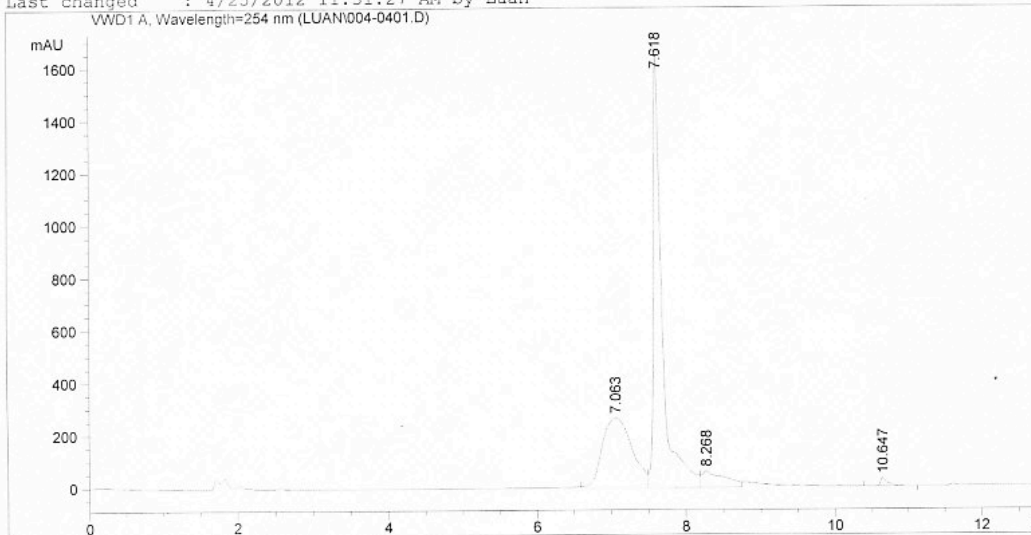
Page 1 of 1

10 min

UV kromatogram av Prøve-2-Inkubert 1 time (buffer m/prodrug+legumain)

Data File D:\DATA\LUAN\004-0401.D
Sample Name: Legu+prodrug-2-prove-med base-1time

```
=====
Acq. Operator   : Luan                      Seq. Line :    4
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 4
Injection Date  : 4/25/2012 10:14:59 AM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 25 µl
Acq. Method     : D:\DATA\LUAN\PROVE-0-UTENBASE-ETTE24TIME-TILSBASE-2.D\GRADIENT 13 MIN LCMS
Last changed    : 4/25/2012 10:13:16 AM by Luan
Analysis Method : D:\METHODS\ALEXANDER\vask.m
Last changed    : 4/25/2012 11:31:27 AM by Luan
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 25.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	7.063	VV	0.4483	7407.87744	267.50400	33.1843
2	7.618	VV	0.1149	1.34010e4	1654.28210	60.0311
3	8.268	VV	0.2661	1307.37317	62.07351	5.8565
4	10.647	VB	0.0920	207.18721	31.23094	0.9281

Totals : 2.23234e4 2015.09055

*** End of Report ***

Instrument 1 4/25/2012 11:35:21 AM Luan

Page 1 of 1

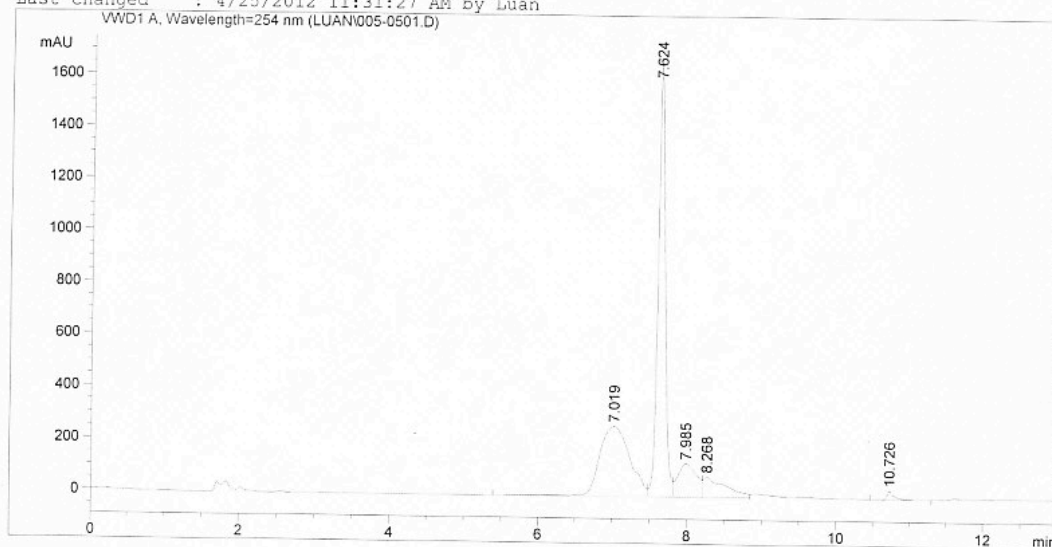
1 time

UV kromatogram av Prøve-3-Inkubert 3 timer (buffer m/prodrug+legumain)

Data File D:\DATA\LUAN\005-0501.D

Sample Name: Legu+prodrug-3-prove-med base-3timer

```
=====
Acq. Operator   : Luan                      Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 5
Injection Date  : 4/25/2012 10:30:08 AM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 25 µl
Acq. Method     : D:\DATA\LUAN\PROVE-0-UTENBASE-ETTE24TIME-TILSBASE-2.D\GRADIENT 13 MIN LCMS
Last changed    : 4/25/2012 10:28:25 AM by Luan
Analysis Method : D:\METHODS\ALEXANDER\vask.m
Last changed    : 4/25/2012 11:31:27 AM by Luan
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 25.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	7.019	VV	0.4553	7541.72461	268.95132	33.2654
2	7.624	VV	0.0977	1.10509e4	1667.78699	48.7440
3	7.985	VV	0.2610	2237.48047	127.79537	9.8692
4	8.268	VV	0.2667	1636.28564	77.03649	7.2174
5	10.726	VB	0.0893	204.93730	32.00452	0.9039

Totals : 2.26714e4 2173.57469

*** End of Report ***

Instrument 1 4/25/2012 11:34:05 AM Luan

Page 1 of 1

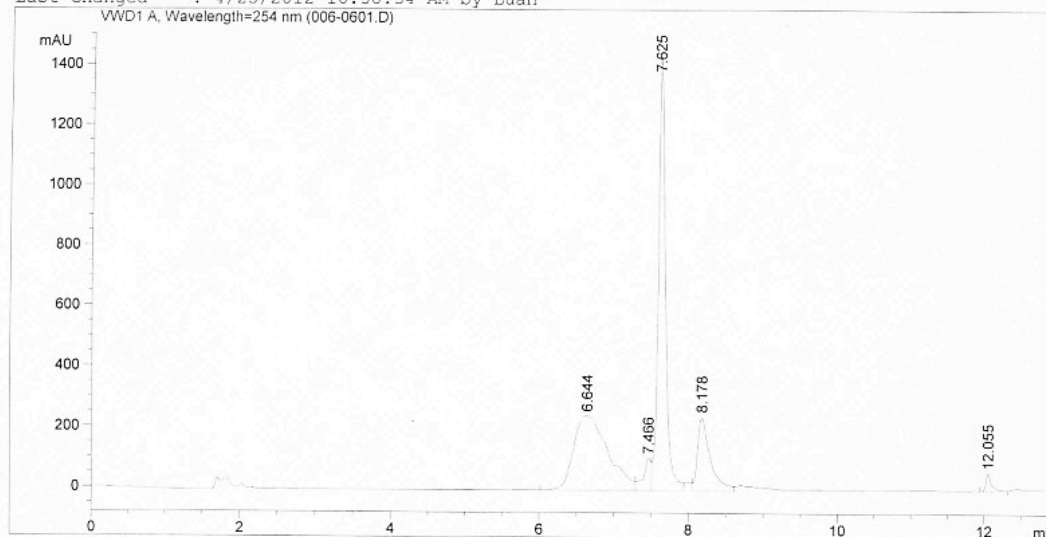
3h

UV kromatogram av Prøve-4-Inkubert 24 timer (buffer m/prodrug+legumain)

Data File D:\DATA\006-0601.D

Sample Name: Legu+prodrug-4-prove-med base-24timer

```
=====
Acq. Operator   : Luan                      Seq. Line :    6
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 6
Injection Date  : 4/25/2012 10:45:22 AM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 25 µl
Sequence File   : D:\SEQUENCE\SEKVEN 10 PROVER GRADIENT 13 MIN.S
Acq. Method     : D:\DATA\LUAN\PROVE-0-UTENBASE-ETTE24TIME-TILSBASE-2.D\GRADIENT 13 MIN LCMS
Last changed    : 4/25/2012 10:43:36 AM by Luan
Analysis Method : D:\DATA\LUAN\PROVE-0-UTENBASE-ETTE24TIME-TILSBASE-2.D\GRADIENT 13 MIN LCMS
Last changed    : 4/25/2012 10:58:34 AM by Luan
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 25.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	6.644	VV	0.4689	7885.63574	245.84349	36.8557
2	7.466	VV	0.0981	752.53101	107.00317	3.5172
3	7.625	VV	0.0967	9581.84473	1436.54565	44.7834
4	8.178	VV	0.1666	2857.77271	242.50114	13.3566
5	12.055	VV	0.0781	318.16788	58.38895	1.4870

Totals : 2.13960e4 2090.28241

*** End of Report ***

Instrument 1 4/25/2012 11:12:30 AM Luan

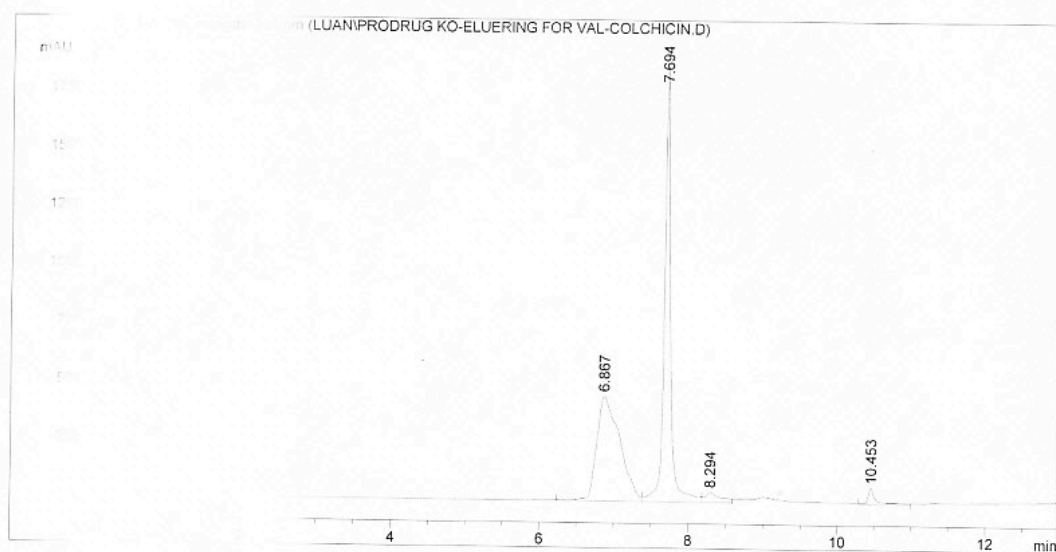
Page 1 of 1

24 h

UV kromatogram av kontroll prøve før tilsetning av valin-colchicin (buffer m/prodrug+legumain)

Data File: L:\MSDCHEM\VALIN\PRODRUG KO-ELUERING FOR VAL-COLCHICIN.D
Sample Name: PRODRUG KO-ELUERING FOR VAL-COLCHICIN

```
=====
Acq. Method: Luan
Acq. Instrument: Instrument 1
Inject: 1/12 012 1:08:18 PM
Location: Vial 1
Inj Volume: 25 µl
Acq. Path: L:\MSDCHEM\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last: 1/12 012 1:06:40 PM by Luan
Analy: L:\MSDCHEM\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last: 1/12 012 1:56:29 PM by Luan
Sample: PRODRUG KO-ELUERING FOR VAL-COLCHICIN
Sample Prep: (by i acetat buffer med base)
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Signal
Mult: 1.0000
Dilu: 1.0000
Sample: 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use: Factor with ISTDs
=====
```

Signal: 254 nm

Peak #	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	9724.77832	452.33115	44.5525	
2	1.09427e4	1863.60022	50.1323	
3	609.23669	43.46189	2.7911	
4	550.95972	68.81955	2.5241	

Total: 2.18277e4 2428.21281

*** End of Report ***

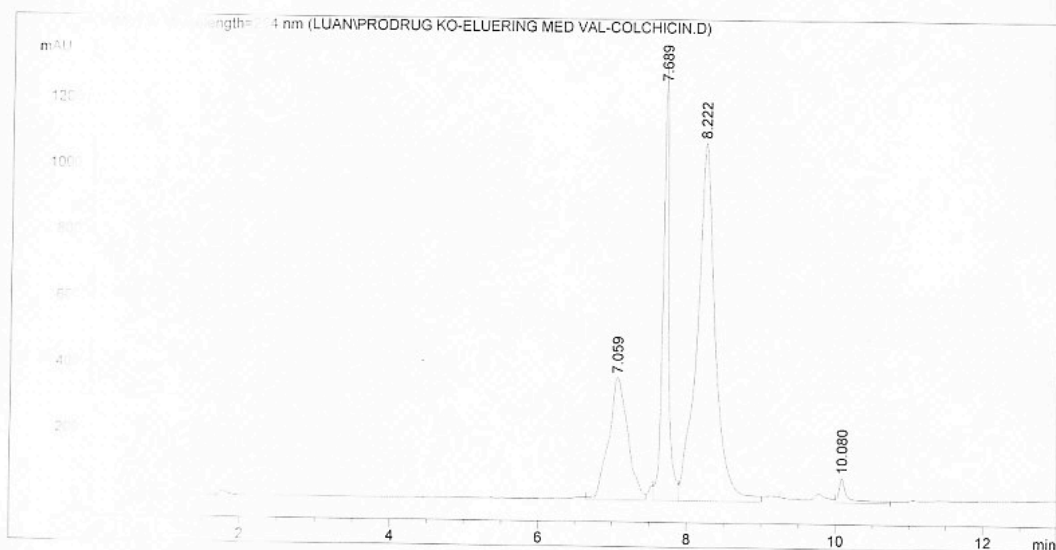
Instrument: PM Luan

Page 1 of 1

UV kromatogram av kontroll prøve etter tilsetning av valin-colchicin (buffer m/prodrug+legumain+valin-colchicin)

Data File: D:\PRODRUG KO-ELUERING MED VAL-COLCHICIN.D
Sample Name: PRODRUG KO-ELUERING med VAL-COLCHICIN

=====
Acq. Operator: Luan
Acq. Instrument: Instrument 1 Location: Vial 1
Injection Date: 4/27/2012 1:36:19 PM Inj Volume: 25 µl
Acq. Method: D:\METHODS\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last changed: 4/27/2012 1:34:40 PM by Luan
Analysis Method: D:\METHODS\Luan\Gradient 13 min LCMS Luan.m
Last changed: 4/27/2012 1:56:29 PM by Luan
Sample Prep: PRODRUG KO-ELUERING med VAL-COLCHICIN
(prodrug i acetat buffer med base + val-colchicin)



Area Percent Report

=====
Sorted by: Signal
Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000
Sample Conc: 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Default Dilution Factor with ISTDs

Signal: Wavelength=254 nm

Peak #	Retention Time [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.059	6658.97949	370.91510	20.3080
2	7.689	7216.15625	1311.75806	22.0072
3	8.222	1.82627e4	1080.20422	55.6961
4	10.080	652.11823	73.87867	1.9888

Total: 3.27900e4 2836.75605

=====
*** End of Report ***

Instrument: Luan 18 PM Luan

Page 1 of 1